

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 697**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97	(2006.01) A61K 36/48	(2006.01)
A61Q 5/00	(2006.01) A61K 36/487	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01) A61K 36/53	(2006.01)
A61K 36/05	(2006.01) A61K 36/537	(2006.01)
A61K 36/13	(2006.01) A61K 36/61	(2006.01)
A61K 36/16	(2006.01) A61K 36/66	(2006.01)
A61K 36/185	(2006.01) A61K 36/87	(2006.01)
A61K 36/24	(2006.01) A61K 36/88	(2006.01)
A61K 36/30	(2006.01) A61K 36/896	(2006.01)
A61K 36/328	(2006.01) A61K 36/8965	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2003 E 03744477 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1485064**

54 Título: **Composición cosmética que contiene fitoalexinas y proceso de obtención de fitoalexinas**

30 Prioridad:

20.03.2002 FR 0203423
26.09.2002 WO PCT/IB02/03971

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.08.2014

73 Titular/es:

ENNAMANY, RACHID (100.0%)
13, RUE GERARD PHILIPPE
33140 VILLENAVE D'ORNON, FR

72 Inventor/es:

ENNAMANY, RACHID

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 482 697 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición cosmética que contiene fitoalexinas y proceso de obtención de fitoalexinas

5 La invención se refiere a una composición para uso tópico, en particular cosmético, rica en metabolitos producidos por las células vegetales indiferenciadas. En particular, la invención se refiere a una composición que contiene una masa de células vegetales indiferenciadas y elicidadas en cultivo *in vitro*.

10 Por células vegetales indiferenciadas, se entiende cualquier célula vegetal que no presenta ninguno de los caracteres de una especialización en particular y que es capaz de vivir por sí misma y que no depende de otras células.

15 Las células vegetales indiferenciadas se pueden obtener a partir de material vegetal derivado de la planta entera o de partes de la planta, tales como hojas, tallos, flores, pétalos, raíces, frutos, su piel, la envoltura que los protege, semillas, anteras, savia, espinas, tallos, corteza, bayas, y mezclas de los mismos.

Preferentemente, las células vegetales indiferenciadas se obtienen a partir de la corteza, hojas, brotes y piel de frutos, en particular de la cutícula del fruto.

20 Las células vegetales indiferenciadas usadas de acuerdo con la invención se pueden obtener de vegetales obtenidos mediante el cultivo *in vivo* o que proviene del cultivo *in vitro*.

Por cultivo *in vivo* se refiere a cualquier cultivo de tipo convencional, es decir en el suelo al aire libre o en invernaderos o incluso fuera del suelo o en medio hidropónico.

25 Por cultivo *in vitro* se refiere al conjunto de técnicas conocidas por el experto en la materia que permiten obtener de manera artificial una planta o parte de una planta. La presión de selección impuesta por las condiciones fisicoquímicas durante el crecimiento de las células vegetales *in vitro* permite obtener un material vegetal estandarizado libre de contaminaciones y disponible durante todo el año, al contrario que las plantas cultivadas *in vivo*.

30 Preferentemente, de acuerdo con la invención se usan células vegetales indiferenciadas que provienen del cultivo *in vitro*.

35 Las células vegetales indiferenciadas que se pueden usar de acuerdo con la invención se pueden obtener mediante cualquier método conocido de la técnica. En este sentido, se pueden mencionar los métodos que se describen en E.F. George y P.D. Sherrington en *Plant Propagation by tissue culture, handbook and directory of commercial laboratories* (Exegetics Ltd 1984).

40 Los medios de cultivo que se pueden usar de acuerdo con la invención son los que generalmente conoce el experto en la materia. A modo de ejemplo, se pueden mencionar los medios de Gamborg, Murashige y Skoog, Heller, White, etc.. En "Plant Culture Média: formulations and uses" de E.F. George, DJM Puttock y H.J George (Exegetics Ltd 1987, tomos 1 y 2) se encontrarán descripciones completas de estos medios.

Preferentemente, de acuerdo con la invención se preparan las células vegetales indiferenciadas cultivadas sobre medio de Murashige y Skoog.

Estado de la técnica

45 A través del documento FR 2795637 se conoce una composición cosmética que contiene un extracto de células vegetales indiferenciadas para evitar los problemas del olor. Esta composición contiene un extracto de células vegetales indiferenciadas pero no elicidadas, de manera que esta composición es pobre en metabolitos secundarios o en fitoalexinas, incluso está sensiblemente libre de dichos compuestos. Además, el presente documento describe el uso de extractos acuosos obtenidos después de la molienda de las células en su medio de cultivo y después de la eliminación de las partículas en suspensión con una pérdida inevitable de metabolitos relacionados con las partículas en suspensión. Con el fin de eliminar las proteasas y en particular las oxidasas, el presente documento también propone el uso de filtros que capturan las moléculas con un peso molecular superior a 100.000 daltons perdiendo de este modo en el extracto final todos los metabolitos por encima de este peso y pueden ser de un gran interés para la industria cosmética. Además, con el fin de eliminar los problemas debidos a la oxidación, el documento propone la adición de estabilizadores, en particular cisteína y/o derivados de azufre, lo que se traduce necesariamente en una pureza menor del extracto con etapas de filtración posteriores. Los métodos que se describen en el presente documento requieren la puesta en marcha de medios complicados para la obtención de extractos cuya, tanto la pureza (numerosos aditivos), como la calidad como la concentración (en metabolitos) no es óptima. Además, las numerosas etapas necesarias para obtener extractos de esta procedencia conllevan altos costes y el riesgo de contaminaciones por parte de las numerosas manipulaciones y aditivos.

65 Se conocen los cultivos de células indiferenciadas, por otra parte se conocen los mecanismos de elicitación de estas células seguido de etapas de extracciones y de diversas filtraciones seguidos de liofilización con el fin de incorporar los extractos obtenidos en una preparación cosmética o farmacéutica. Dichos procedimientos se describen por ejemplo en la patente de Estados Unidos N° 4.241.536; el documento EP 378 921, el documento WO 88/00968, el

documento EP 1 203 811, etc. para especies de plantas diversas. El contenido de estos documentos se incorpora en la presente descripción por referencia para describir medios de cultivo, especies de plantas, posibles agentes de elicitación, etc.

5 El documento EP378921 describe métodos para la producción de metabolitos de plantas por elicitación que comprende una etapa de aislamiento del metabolito mencionado del medio de producción mencionado.

El documento FR2808190 describe composiciones que contienen un extracto de la planta *Vitis vinifera*, realizando la extracción por medio de un disolvente orgánico.

10 El documento FR2795637 describe composiciones que comprenden un extracto de células vegetales indiferenciadas, estrato en el que las partículas finas se han eliminado.

15 El artículo "Changes in the fitoalexina content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation", Douillet-Breuil *et al.*, Journal of Agricultural and Food chemistry, US, octubre de 1999, volumen 47, número 10 describe la producción de fitoalexina de *Vitis vinifera* en función de una radiación UV-C.

20 En la actualidad, a pesar de las habilidades y el conocimiento de las industrias en el campo de extractos de plantas, y a pesar del progreso de la química orgánica, son indispensables diversas etapas de extracción para obtener una materia prima vegetal.

Se atribuyen varios inconvenientes a estas extracciones:

- 25 - pérdida de la estructura terciaria de las moléculas aisladas,
- presencia de diferentes disolventes en el producto acabado,
- heterogeneidad de los sustratos que requieren extracciones finas mediante el uso de disolventes cada vez más tóxicos,
- calidad del extracto en función del estado fisiológico de la planta en el momento de la cosecha,
- 30 - producción del extracto limitada en función de las estaciones del año.

En vista de estos factores limitantes y con el aumento de interés de los consumidores por todo lo que tiene un origen natural, se han realizado diversos intentos para obtener células. Por lo tanto, hasta la fecha, se han usado dos procedimientos principales:

- 35 - El cultivo de células a partir de organismos unicelulares o de microorganismos, técnica poco original que se basa en la reproducción de las condiciones normales de vida. Sin embargo, estos organismos son primitivos y no desarrollan metabolismo secundario, fuente de los principios activos más interesantes.
- La obtención de células a partir de frutas (células frescas) después de la digestión enzimática. Las limitaciones de este procedimiento residen en el hecho de que las frutas no son asépticas y pueden contener restos de pesticidas (fungicidas, herbicidas, insecticidas, etc.). Por otro lado, las enzimas (celulasas, pectinasas, etc.) usadas en cantidad importante (2 %, P/P) para la digestión de las paredes vegetales y para la obtención de células sin pared (protoplastos) se encuentran en el producto acabado. Por otra parte, las enzimas usadas pueden alterar la calidad de los metabolitos. Por último, el uso de esta técnica solamente permite recuperar protoplastos (células sin pared celular), estructuras frágiles que no pueden dirigir su metabolismo.
- 40
- 45

Los inventores han desarrollado una tecnología innovadora y controlada, que garantiza la calidad y la autenticidad de los productos. Se trata de la puesta en cultivo de células de plantas superiores indiferenciadas.

En efecto, y por primera vez, un procedimiento industrial permite obtener células a partir de plantas superiores mediante un proceso sin modificación alguna de su patrimonio genético, lo que permite que la célula mantenga sus características fisiológicas.

50 El mantenimiento de diferentes cepas se garantiza con subcultivos regulares, con un dominio total de las diferentes condiciones del cultivo.

La ventaja de este procedimiento es que permite el cultivo de células vegetales indiferenciadas en grandes volúmenes siempre respondiendo a las necesidades de la industria, en particular:

- El respeto a la estructura terciaria de las moléculas,
- La ausencia de disolvente y de residuos,
- La homogeneidad de los sustratos,
- 60 - La producción continua independientemente del ciclo de las estaciones,
- La conservación de las características biológicas y fisiológicas sin añadir conservantes,
- La ausencia total de contaminantes,
- La producción estandarizada y reproducible con respecto a la calidad hacia la concentración de metabolitos,
- El uso de estas suspensiones vegetales después de la liofilización directa con el uso de una temperatura inferior a -30 °C. Esta técnica permite la obtención de un polvo muy fino que se puede dispersar en composiciones cosméticas (cremas, pomadas, lociones, etc.). Estas células son capaces de liberar directamente los principios
- 65

activos que contienen, sin pasar por una extracción a través de disolventes orgánicos (eliminación de riesgos de residuos). Sin embargo, es preferente someter el productote liofilización a una molienda para evitar cualquier aglomeración de partículas.

- El uso de extractos celulares solamente después de sonicación y centrifugación.

5 Esta tecnología proporciona una alternativa útil e innovadora a las extracciones convencionales con disolventes. La posibilidad de dirigir de una forma natural (elicitación) la síntesis de metabolitos sin perjuicio de la integridad genética de las células, representa una garantía de calidad y de autenticidad.

10 De manera bastante sorprendente, los inventores han descubierto que se podría incorporar directamente o dispersar las células después de la elicitación, secar y moler en una composición cosmética y/o farmacéutica. La composición de acuerdo con la invención contiene entonces membranas de células, por gránulos cito plasmáticos y materia vacuolar. Este procedimiento presenta en particular la ventaja de desactivar las enzimas oxidantes sin adiciones de aditivos o de productos químicos. Otro aspecto de la invención permite concentrar y dirigir la producción de fitoalexinas sin pérdidas cuantitativas ni cualitativas bebidas a las extracciones y a los filtrados. Un aspecto particular de la invención es que evita las etapas de extracción y de filtrado permite la obtención de un homogenado de células sin aditivos, disolventes ni residuos, pudiendo dispersar el homogenado mencionado directamente en una composición cosmética. La composición de acuerdo con la invención contiene al menos un homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicidadas en cultivo *in vitro* para sintetizar al menos una fitoalexina, siendo dicha elicitación ventajosa para sintetizar al menos una fitoalexina si se realiza después de una etapa de cultivo *in vitro* de células vegetales sin elicitación, en la que el homogenado que se ha mencionado anteriormente contiene al menos una fitoalexina que comprende al menos un 95 %, de forma ventajosa al menos un 97 %, preferentemente al menos un 99 % en peso del conjunto de materias secas que resultan de las células vegetales a un homogenadas indiferenciadas y elicidadas *in vitro*, siendo dicho homogenado dispersado en dicha composición o estando en una forma apta para su dispersión en dicha composición. En particular, el homogenado contiene básicamente todas las materias secas (después de la extracción del agua presente en las células) de las células vegetales indiferenciadas y elicidadas a un homogenadas. Dicho homogenado rico en fitoalexina con respecto al contenido de células sin homogeneizar contiene sin embargo todas las materias naturales presentes en las células.

30 El objeto de la presente invención es, entre otros, proponer un procedimiento simple que excluye el uso de aditivos y de productos químicos y que respeta el carácter natural de las células obtenidas. Además, la obtención por medios físicos permite dirigir y concentrar la producción de metabolitos buscados por la industria cosmética. El aspecto particular de la invención que respeta la integridad de las células obtenidas y en su elicitación permite por un lado optimizar la concentración y la calidad de los metabolitos obtenidos, y por otro lado resolver los problemas de oxidación al inactivar las enzimas por un simple secado (liofilización) sin añadir aditivos y sin pérdidas debidas a filtraciones y que por último permite la dispersión del homogenado obtenido directamente en una preparación cosmética.

40 Por elicitación en el medio de cultivo, se hace referencia a la puesta en práctica de una tensión o un ataque (biológico, químico o físico) sobre las células en su medio de cultivo con el fin de provocar uno o varios mecanismos de defensa.

45 A lo largo de su desarrollo, las plantas se ven sometidas a ataques continuos por parte de su entorno. Sin embargo, a menudo se muestran capaces de resistir naturalmente estos ataques exteriores gracias a la presencia o la activación de mecanismos de defensa (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Por lo tanto, aunque determinados de estos mecanismos constituyen y proporcionan una barrera física y química para un ataque, otros no se elicitan más que después de un ataque por una plaga.

50 Una vez que una planta detecta un patógeno, se establece uno de los sistemas de defensa natural más eficaces: la respuesta de hipersensibilidad. En el sitio de la penetración del agente patógeno, esta reacción, rápida y violenta, se traduce en la muerte de las primeras células infectadas y la aparición de una pequeña zona necrótica, que aísla de este modo las células infectadas del resto de la planta (Dang1 *et al*, 1996; Lamb y Dixon, 1997). El inicio de esta respuesta depende de un reconocimiento específico del agente patógeno por la planta huésped. De hecho, la planta atacada reconoce a través de una proteína (receptor), una proteína producida por el patógeno, denominada elicitador. En la planta, los genes que codifican las proteínas receptoras se conocen genes de resistencia (genes R), y los patógenos, genes que codifican las moléculas elicitoras se denominan genes de avirulencia (genes Avr): entonces aquí se habla de una relación gen a gen o de la relación R-Avr (Hammond-Kosack, 1996). Otras moléculas, calificadas como elicidores generales también son capaces de iniciar (de modo menos específico que los elicidores que se han mencionado anteriormente) esta reacción de defensa de la planta huésped. Estos son lo más a menudo oligosacáridos liberados por el patógeno (elicidores exógenos) o la célula vegetal (elicidores endógenos) (Scheel y Parker, 1996).

65 A esta reacción de hipersensibilidad le sigue la activación de una reacción de defensa intensa en las células vecinas de la zona infectada, es la reacción local. Por último, la expedición de varios advertencia a todos los demás órganos de las señales de las plantas, lo que le permite responder más rápida y efectivamente en un nuevo ataque, se le llama una reacción sistémica.

Durante estas reacciones, se pueden activar tres categorías de sistemas de defensa:

- la formación de una epidermis de cicatrización y el fortalecimiento de las paredes (lignificación, etc.) (Dai *et al.*, 1995);
- la síntesis de proteínas de defensa o «Relacionadas con la Patogénesis» (PRs) proteínas descubiertas en 1970 en el Tabaco. Entre estas PRs se encuentran, por ejemplo, inhibidores de la proteasa (Ryan, 1992), enzimas hidrolíticas, tales como las quitinasas o las β -1,3 glucanasas (Derckel *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997, Kraeva *et al.*, 1998; Salzman *et al.*, 1998; Renault *et al.*, 2000);
- y la síntesis de metabolitos secundarios de tipo fitoalexinas. Entre los metabolitos secundarios, ya se han caracterizado más de 300 fitoalexinas. Pertenecen a un amplio espectro de diferentes clases químicas entre las que se pueden mencionar cumarinas, benzofuranos, terpenos, alcaloides, determinados polifenoles (Smith, 1996), etc.

El establecimiento de reacciones de defensa de las plantas implica todo una variedad de señales de transducción que conducen a la elicitación rápida de la expresión de genes de defensa. Por lo tanto, el reconocimiento del agente patógeno por la planta huésped va a activar toda una cascada de señales en las células atacadas, tales como la fosforilación de proteínas por proteínas quinasas, los flujos de especies iónicas (Ca^{2+}), la formación de especies oxigenadas reactivas (Coté y Hahn, 1994; Shibuya *et al.*, 1996; Benhamou, 1996), etc.

Además, las células atacadas son capaces de producir señales de alarma transmitidas a las células vecinas (respuesta local), así como a toda la planta que genera de este modo, tal como se ha indicado en el párrafo anterior, el fenómeno de reacción sistémica.

El mecanismo de resistencia sistémica más estudiado es el fenómeno de SAR o "resistencia sistémica adquirida." El término SAR ha sido definido por Ross 1961. Se describe la aparición de resistencia de una planta después de un ataque por un agente patógeno, tanto en las partes infectadas como en las partes sanas de la planta. Se desarrolla, en general, después de la aparición de lesiones necróticas alrededor del sitio de inoculación. Esta respuesta de hipersensibilidad localizada restringe el patógeno en, y alrededor del sitio de infección, y parece que hace a la planta más resistente a los ataques por diversos organismos (Ryals *et al.*, 1996). ¿Cómo son capaces las partes distantes del sitio de infección de adquirir esta resistencia? Fue en 1966 cuando Ross desarrolló la idea de la existencia de moléculas de señal que, a bajas concentraciones, serían capaces de activar mecanismos de defensa en los tejidos alejados de la zona infectada.

En las plantas pueden intervenir tres tipos de moléculas como señal de alarma a los niveles intra e intercelular, a corta o larga distancia: ácido salicílico, etileno y los jasmonatos.

El mecanismo de transducción más estudiado y el mejor conocido en el desarrollo de la SAR es el que implica al ácido salicílico (AS) (Delaney *et al.*, 1994; Ryals *et al.*, 1996).

Por un lado, la adquisición de resistencia de determinadas plantas está relacionada directamente con un aumento de la síntesis endógena de AS o de sus derivados (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1991; Smith-Becker *et al.*, 1998). En este tipo de respuesta, cuando se inicia la síntesis de AS, la transducción de la señal como realizaría a larga distancia, bien por transporte directo del AS (Shulaev *et al.*, 1995), bien por conversión de este último salicilato de metilo (MeSa), molécula de señal volátil que puede conducir a la aparición de resistencia no solamente en los tejidos sanos de la planta infectada, sino también en las plantas vecinas (Shulaev *et al.*, 1997). Además, la evidencia del papel que desempeña el AS en el comienzo de la SAR se relaciona con el uso de plantas de Tabaco transgénicas que expresan el gen NahG bacteriano. Este gen, que codifica la salicilato hidroxilasa, inactiva el AS mediante la conversión en catecol, lo que hace que las plantas transformadas sean incapaces de desarrollar una SAR.

Por otra parte, determinados estudios muestran que la aplicación de AS exógeno es capaz de inducir una resistencia a las diferentes lesiones causadas por una bacteria, un virus o un agente patógeno. Por lo tanto, en el Tabaco, se observa una reducción de los síntomas relacionados con la inoculación del virus del Mosaico del Tabaco después del tratamiento con AS (White *et al.*, 1983). Del mismo modo, el AS es capaz de estimular la biosíntesis de diferentes proteínas PR producidas normalmente en el caso de una SAR (Renault *et al.*, 1996; Narusaka *et al.*, 1999).

Diferentes estudios han demostrado que determinadas reacciones de defensa se podrían activar independientemente de la presencia de AS. Por lo tanto, otros tipos de moléculas se han identificado como moléculas de señalización de la SAR (Enyedi *et al.*, 1992; Pieterse *et al.*, 1999). Estas reacciones harían intervenir principalmente a dos reguladores del crecimiento vegetal, el etileno y el ácido jasmónico (AJ), como señales de elicitación de defensa sistémica. De hecho, estos dos tipos de moléculas se pueden producir rápidamente, de forma endógena, cuando una planta se somete a un ataque, y por lo tanto causar la aparición de una resistencia. Además, también son capaces de inducir la expresión de determinadas PR y/o la producción de fitoalexinas.

- El etileno es una fitohormona vegetal volátil que intervienen en numerosos procesos fisiológicos de las plantas. Su papel en los fenómenos de defensa vegetal se ha demostrado por varios equipos. Los estudios han demostrado que el ataque de una planta por un patógeno o un herbívoro podría estar correlacionado con una elicitación o con un aumento de la síntesis de etileno endógeno en la planta huésped (O'Donnell *et al.*, 1996; Popp *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 1998). Además, del mismo modo que el AS, la aplicación de etileno exógeno también es capaz de estimular la síntesis de proteínas PR (Ward *et al.*, 1991; Penninckx *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). Por último, la activación de proteínas de defensa en *Arabidopsis* como respuesta a un patógeno se puede bloquear en el caso de mutantes deficientes en la percepción de esta señal (Penninckx *et al.*, 1998).
- El ácido jasmónico y su éster de metilo, el jasmonato de metilo (MeJa), son compuestos naturales similares a los análogos de ciclopentanona en las prostaglandinas animales por su biosíntesis y su función (Creelman *et al.*, 1992; Mason *et al.*, 1993; Sadka *et al.*, 1994). Tienen su origen en ácidos grasos y se sintetizan a partir de la oxidación dependiente de lipoxigenasas del ácido α -linolénico. Se habla de la ruta octadecanoica.
- Además de su papel en diversas funciones fisiológicas (Stawick, 1992), estos compuestos se han visto implicados recientemente como moléculas de señalización intracelular sintetizadas como respuesta a un estrés, biótico o abiótico, y que conduce a respuestas de defensa de las plantas, como la biosíntesis fitoalexinas o de proteínas de defensa (Gundlach *et al.*, 1992; Bleichert *et al.*, 1995; Creelman *et al.*, 1995; Doares *et al.*, 1995; Conconi *et al.*, 1996a y 1996b; Ignatov *et al.*, 1996; Baldwin *et al.*, 1997).
- Por una parte, la aplicación de MeJa, derivado volátil del ácido jasmónico, induce la producción de numerosos metabolitos secundarios, *in vivo* o *in vitro* (en cultivos celulares), algunos de los cuales desempeñan el papel de compuestos de defensa. De hecho, este éster es capaz de elicitar la biosíntesis de furanocumarinas en las hojas de Apio (Miksch y Boland, 1996), de momilactona A en cultivos celulares de Arroz (Nojiri *et al.*, 1996), de alcaloides de plantas jóvenes o de cultivos celulares de *Catharanthus roseus* (Aerts *et al.*, 1996; Gantet *et al.*, 1997) y de plantas jóvenes de *Cinchona ledgeriana* (Aerts *et al.*, 1994; 1996). Otros derivados precursores de AJ, tales como el ácido 12-oxo-fitodienoico, son capaces de actuar sobre la biosíntesis de numerosos metabolitos secundarios.
- El efecto inductor de estos compuestos a menudo va precedido por una activación de la expresión de los genes o de la síntesis de enzimas intervienen en la biosíntesis de estos diversos metabolitos. Entre estas enzimas, se encuentran la fenilalanina amonialiasa (PAL), la 4-cumarato-CoA ligasa (4CL), la chalcona sintasa (CHS), la dihidroflavonol-4-reductasa (DFR), la polifenol oxidasa (PPO), la berceptol metil transferasa (BMT), la tirosina/dopa descarboxilasa (TYDC), etc., (Dittrich *et al.*, 1992; Gundlach *et al.*, 1992; Mizukami *et al.*, 1993; Tamari *et al.*, 1995; Ellard-Ivey *et al.*, 1996; Facchini *et al.*, 1996; Ignatov *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Yasaki *et al.*, 1997; Constanbel et Ryan, 1998).
- Por otra parte, la exposición de las plantas a los vapores de MeJa, permite elicitar mecanismos de defensa similares a los inducidos por insectos, herbívoros, una lesión o los UV (Farmer y Ryan, 1990; 1992; Conconi *et al.*, 1996b; Ozawa *et al.*, 2000). Por lo tanto, los jasmonatos, y, en particular el MeJa, son capaces de inducir la biosíntesis de proteínas de defensa y de estrés, también denominadas JIP (Proteínas elicidadas con Jasmonato), (Reinbothe *et al.*, 1994).
- Además, el tratamiento de plantas de Tomate, Patata o de Alfalfa con el MeJa, induce la expresión de inhibidores de proteasas (Farmer et Ryan, 1990, 1992; Hildmann *et al.*, 1992; Pena-Cortes *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1996), la biosíntesis de tionina en la Cebada (Reinbothe *et al.*, 1997), proteínas ricas en prolina o Vsp (Proteínas de almacenamiento vegetativo) de granos de Soja (Stawick *et al.*, 1991; Creelman *et al.*, 1992; Mason *et al.*, 1992, 1993; Berger *et al.*, 1995).
- Por último, está implicado del mismo modo en la regulación de la biosíntesis de proteínas que participan en la transducción de señales como respuesta a un estrés, tales como por ejemplo las lipoxigenasas (Saravitz y Siedow, 1996) o más aún la sistémica (Reinbothe *et al.*, 1994; Bergey *et al.*, 1996).
- Por lo tanto, no es sorprendente que diferentes equipos hayan mostrado una disminución de la incidencia de determinadas enfermedades después de un tratamiento de la planta afectada por los vapores de MeJa (Cohen *et al.*, 1993; Meir *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 2000). Además, J.S. Thaler (1999) muestra que para numerosas plantas, diversos mecanismos de defensa contra el ataque de herbívoros se elicitan a través de la vía octadecanoica y de este modo se verían implicados en la atracción de los enemigos naturales. Por ejemplo, se muestra que el tratamiento de plantas con el AJ aumenta el parasitismo de plagas de orugas.
- En la Vid, los mecanismos de señalización implicados en la expresión de las reacciones de defensa todavía no se conocen bien. Sin embargo, nos encontramos con la síntesis de los tres tipos de moléculas de defensa (lignina, proteínas de defensa y fitoalexinas). En particular, el papel de las fitoalexinas se mantiene notablemente por una familia de compuestos originales: los polifenoles (Deloire *et al.*, 2000).
- Presentes en cantidades más grandes o menos grandes en todos los órganos de la planta, las fitoalexinas se pueden inducir en hojas y bayas. Este tipo de elicitación se conoce con el término elicitación. Los factores de

elicitación (o elicidores) pueden tener distintos orígenes. Se puede tratar de:

- elicitación biótica, por ejemplo durante un ataque de un patógeno tal como *Botrytis cinerea*, agente Moho gris (Jeandet *et al.*, 1995; Bavaresco *et al.*, 1997), *Plasmopara viticola*, agente del Mildiu (Dercks y Creasy, 1989) o *Phomopsis viticola*, responsable de la Excoriosis (Hoos y Blaich, 1990).
- elicitación abiótica por factores ambientales tales como la radiación UV, temperatura, luz, asfixia, agentes naturales extraídos de otras plantas (Jeandet *et al.*, 1997; Langcake y Pryce, 1977b; Douillet-Breuil *et al.*, 1999), el cloruro de aluminio (Adrian *et al.*, 1996) o el ozono (Sarig *et al.*, 1996).

Durante una elicitación, las fitoalexinas tales como trans-resveratrol, trans-piceído, ϵ -viniferina y pterostilbeno, se pueden inducir a nivel de las hojas y las bayas (Soleas *et al.*, 1997). Esta propiedad de biosíntesis de novo de las fitoalexinas como respuesta a un estrés, y en particular después del ataque por un agente patógeno, sugiere que estas moléculas podrían desempeñar el papel de defensa natural de las plantas.

Este papel de las moléculas de defensa se confirma con determinados estudios que parecen indicar una correlación estrecha entre el nivel de resistencia natural de la planta y su capacidad para sintetizar estas moléculas. Por ejemplo, Langcake y Mc Carthy (1979) han puesto en evidencia una relación entre la resistencia de determinadas especies del género *Vitis* de *Botrytis cinerea* o *Plasmopara viticola* y su capacidad de biosíntesis de fitoalexinas (resveratrol y viniferina). Además, Dercks y Creasy (1989) han mostrado que las especies resistentes a *Plasmopara viticola* producen cinco veces más de fitoalexinas que las especies sensibles. Del mismo modo, dentro de *Vinifera*, se encuentran variedades más o menos tolerantes al ataque por hongos de acuerdo con su capacidad de producción de fitoalexinas.

La elicitación de las células se puede realizar por medio de agentes o de estrés diverso, tales como presión, depresión, vacío, variación de la presión, presencia de un gas, atmósfera variable, temperatura, frío, luz, ciclo de luz, radiación, toxina, toxina vegetal, agitación, bacteria, virus, hongos, microorganismo, ultrasonido, IR, UV, asfixia, etc.

Cualquier método conocido de elicitación conocido por el experto en la materia se puede usar para preparar un homogenado que se pueda usar en la composición de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, los homogenados que se pueden usar de acuerdo con la invención pueden tomar cualquier forma conocida. En particular, se pueden mencionar los homogenados acuosos, alcohólicos, en particular etanólicos o incluso hidroalcohólicos.

Preferentemente de acuerdo con la invención, el homogenado es un homogenado acuoso o un homogenado seco o básicamente seco.

De forma ventajosa, el homogenado se puede liofilizar en una etapa posterior. De acuerdo con una forma de realización ventajosa, el homogenado es un homogenado de células en su medio de cultivo o en un extracto del medio de cultivo, siendo dicho homogenado secado o liofilizado posteriormente.

Por lo tanto, la invención se refiere a una composición cosmética que contiene al menos un medio de células vegetales indiferenciadas, caracterizado por que dicho medio es un homogenado, de células vegetales indiferenciadas, cultivadas en un medio de cultivo *in vitro* y elicidadas en el medio de cultivo *in vitro*, de al menos una especie seleccionada entre *Salvia*, *Coleus*, *Rosmarinus*, *Ginkgo*, *Cannabis*, *Colchicum*, *Gloriosa*, *Asparagus*, *Arganier*, *Glycine*, *Medicago*, *Mungo*, *Erythrina*, *Oenothera*, *Papaver*, *Atropa*, *Datura*, *Solanum*, *Borago*, *Reseda*, *Amsonia*, *Catharantus*, *Pilocarpus*, *Digitalis*, *Coffea*, *Theobroma*, *Jasminum*, *Capsicum*, *Iris*, *vigne*, *taxus*, *séquoia*, *chlorophytum*, *cacao*, *psoralea corylifolia*, *vitex negundo*, *commiphora wighii*, *eucalyptus punctata*, *lavandula angustifolia*, *citrus limon*, *vanilla planifolia*, *marrubium vulgare*, *pilocarpus jaborandi*, *roses*, *betula*, *thé* y las mezclas de células de dichas especies, estando disperso dicho homogenado en dicha composición o estando bajo una forma apta para su dispersión en dicha composición. Las células vegetales se cultivan en un medio de cultivo *in vitro* y se elicitan en un medio de cultivo *in vitro* para sintetizar al menos una fitoalexina, siendo dicha elicitación realizada de forma ventajosa después de la etapa de cultivo *in vitro* de las células vegetales sindico básicamente sin elicitación para sintetizar al menos una fitoalexina. Dicho homogenado contiene al menos una fitoalexina que comprende al menos un 95 %, de forma ventajosa al menos un 97 %, preferentemente al menos un 99 % en peso del conjunto de las materias secas que resultan de las células vegetales homogenadas indiferenciadas y elicidadas *in vitro*, estando dicho homogenado disperso en dicha composición o estando bajo una forma apta para su dispersión en dicha composición. De forma preferente, básicamente todo, o incluso la totalidad de los materiales secos que resultan de las células vegetales indiferenciadas y elicidadas *in vitro*.

En el caso en el que las células se laven para eliminar todo en el medio de cultivo presente, sin afectar a la estructura de membrana de las células, es posible obtener un homogenado de células indiferenciadas elicidadas que no contienen el medio de cultivo (por ejemplo menos de un 0,1 % en peso con respecto al peso de las células a un homogenadas). De forma ventajosa, el homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicidadas *in vitro* comprende partículas que provienen de las vacuolas, partículas que provienen del citoplasma y partículas que provienen de la membrana pecto celulósica, conteniendo dicho homogenado al menos un 0,1 % en peso de

fitoalexina(s).

Por ejemplo, la composición contiene de un 0,005 a un 25 % en peso, de forma ventajosa de un 0,005 a un 5 % en peso de medio u homogenado de células vegetales indiferenciadas, calculando dicho peso en forma seca.

5 De forma ventajosa, la composición contiene un medio u homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro*. Preferentemente, el homogenado es un homogenado seco o básicamente seco de células vegetales indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro*, teniendo dicho homogenado seco o básicamente seco un contenido en agua inferior a un 25 % en peso, de forma ventajosa inferior a un 15 % en peso, preferentemente inferior a un 10 % en peso. En particular, dicho homogenado seco o básicamente seco contiene una cantidad de agua suficiente para asegurar la integridad de la membrana de las células antes de la etapa de homogeneización.

15 El homogenado tiene de forma ventajosa un tamaño de partícula medio de partículas sólidas inferior a 100 µm, de forma ventajosa inferior a 10 µm, preferentemente inferior a 1 µm. de forma ventajosa, las partículas del homogenado tienen un tamaño de partícula de modo que un 90 % en peso de partículas de células a un homogenadas tienen un tamaño de partícula comprendido en el rango de tamaño de partícula medio de - 25 % hasta un tamaño de partícula medio de + 25 %.

20 De acuerdo con una forma de realización en particular, dicho homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro* contiene al menos una fitoalexina sintetizada mediante la elicitación de las células vegetales indiferenciadas en el medio de cultivo *in vitro*, o una mezcla de dichas fitoalexinas.

25 De acuerdo con una particularidad ventajosa de una forma de realización, dicho homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas es un homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas por un agente en el medio de cultivo *in vitro*, estando dicho homogenado básicamente exento de dicho agente después de la elicitación en el medio de cultivo *in vitro*.

30 De acuerdo con otra particularidad ventajosa de una forma de realización, dicho homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas es un homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas por un agente en el medio de cultivo, siendo dicho agente un agente cuya presencia se desea en la composición cosmética, tal como por ejemplo, un tensioactivo, un agente dispersante, un ácido, etc.

De acuerdo con una forma de realización preferente, las células indiferenciadas se elicitan en el medio de cultivo *in vitro* por un agente volátil, en particular un gas, tal como CO₂.

35 De acuerdo con una forma de realización preferente, las células indiferenciadas se elicitan en el medio de cultivo *in vitro* por un agente físico, en particular la temperatura, la luz, los campos electromagnéticos, la radiación UV, la presión, la asfixia.

40 De acuerdo con un detalle de una forma de realización, dicho homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro* contiene al menos un compuesto terpénico o tánico o polifenólico, siendo sintetizado dicho compuesto mediante la elicitación *in vitro* de las células vegetales indiferenciadas en su medio de cultivo.

45 De forma ventajosa, el homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro* se presenta en forma de una suspensión viscosa o de un gel o de un homogenado básicamente seco, estando dicha suspensión, gel u homogenado en una forma que se puede dispersar en la composición.

50 De acuerdo con una forma de realización en particular, el homogenado de células es un homogenado de células de vid indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro*.

De acuerdo con un detalle de una forma de realización preferente, la composición contiene un homogenado de células indiferenciadas, cultivadas y elicitadas en su medio de cultivo *in vitro*.

55 De acuerdo con una forma de realización ventajosa, la composición contiene un medio de células indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro*, en particular un homogenado de células indiferenciadas y elicitadas, conteniendo dicho medio u homogenado al menos un 0,1 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células, en particular al menos un 0,2 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células, preferentemente al menos un 0,5 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células.

60 En la composición de acuerdo con la invención, el homogenado tiene su origen en el cultivo de células vegetales indiferenciadas, elicitadas en el medio de cultivo *in vitro* a continuación secadas de las especies *Salvia*, *Coleus*, *Rosmarinus*, *Ginkgo*, *Cannabis*, *Colchicum*, *Gloriosa*, *Asparagus*, *Arganier*, *Glycine*, *Medicago*, *Mungo*, *Erythrina*, *Oenothera*, *Papaver*, *Atropa*, *Datura*, *Solanum*, *Borago*, *Reseda*, *Amsonia*, *Catharantus*, *Pilocarpus*, *Digitalis*, *Coffea*, *Theobroma*, *Jasminum*, *Capsicum*, *Iris*, *vigne*, *taxus*, *séquoia*, *chlorophytum*, *Cacao*, *psoralea corylifolia*, *vitex negundo*, *commiphora wighii*, *eucalyptus punctata*, *lavandula angustifolia*, *citrus limon*, *vanilla planifolia*, *marrubium vulgare*, *pilocarpus jaborandi*, *roses*, *betula*, *thé*, y las mezclas de células de dichas especies.

65

- De acuerdo con una forma de realización posible, la composición de acuerdo con la invención comprende células vegetales indiferenciadas elicitadas homogenadas (por ejemplo con un tamaño de partícula inferior a 5 µm) y células vegetales indiferenciadas elicitadas no homogenadas u homogenadas de forma más gruesa, siendo las células vegetales indiferenciadas elicitadas no homogenadas u homogenadas de forma más gruesa siendo idénticas o diferentes a las células elicitadas homogenadas y/o presentando una elicitación diferente a la de las células elicitadas homogenadas. De acuerdo con una forma de realización en particular, las células vegetales indiferenciadas elicitadas se separan en dos fracciones distintas, sometiendo a una primera a un homogenado fino, mientras que la segunda se somete a un homogenado más grueso en el que no se homogeneiza.
- Además, la invención tiene como objetivo, un procedimiento de preparación de una composición de uso tópico de acuerdo con la invención. En este procedimiento, se encuentran células vegetales indiferenciadas de al menos una especie elegida entre *Salvia*, *Coleus*, *Rosmarinus*, *Ginkgo*, *Cannabis*, *Colchicum*, *Gloriosa*, *Asparagus*, *Arganier*, *Glycine*, *Medicago*, *Mungo*, *Erythrina*, *Oenothera*, *Papaver*, *Atropa*, *Datura*, *Solanum*, *Borago*, *Reseda*, *Amsonia*, *Catharantus*, *Pilocarpus*, *Digitalis*, *Coffea*, *Theobroma*, *Jasminum*, *Capsicum*, *Iris*, *vigne*, *taxus*, *séquoia*, *chlorophytum*, *cacao*, *psoralea coryifolia*, *vitex negundo*, *commiphora wighii*, *eucalyptus punctata*, *lavandula angustifolia*, *citrus limon*, *vanilla planifolia*, *marrubium vulgare*, *pilocarpus jaborandi*, *roses*, *betula*, *thé* y las mezclas de células de dichas especies en un medio de cultivo *in vitro* de manera que se permita un crecimiento de las células, se elicitan dichas células vegetales diferenciadas en su medio de cultivo *in vitro* durante un periodo de tiempo suficiente para la síntesis de una cantidad suficiente de metabolito(s), en particular de al menos un metabolito secundario, preferentemente al menos una fitoalexina o una mezcla de fitoalexinas, y se mezcla al menos un medio u homogenado de células vegetales elicitadas del medio de cultivo, con uno o más excipientes para preparar una composición de uso tópico, en particular cosmética, por ejemplo para el tratamiento de la piel, cabello, cuero, uñas, etc.. Las células elicitadas se homogeneizan antes y/o después de su mezcla con uno o varios excipientes de la composición. Aunque es posible someter a las células indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro* a un a un homogenado, es ventajoso separar las células indiferenciadas y elicitadas del medio de cultivo sin afectar básicamente a las membranas de las células y someter a continuación a un homogenado, de forma ventajosa después de una o varias etapas de lavado sin afectar básicamente a las membranas de las células y/o después de una o varias etapas de secado.
- De acuerdo con una forma de realización en particular, les células vegetales indiferenciadas se someten sucesivamente a etapas de cultivo *in vitro* sin elicitación y a etapas de cultivo *in vitro* con elicitación.
- De forma ventajosa, las células elicitadas se separan del medio de cultivo *in vitro*, y dicho estrato se somete a un secado, seguido de un homogenado.
- Aunque sea posible liofilizar las células indiferenciadas elicitadas separadas y lavadas sin afectar a la estructura de las membranas de las células y homogeneizar a continuación el liofilizado, es ventajoso someter a las células indiferenciadas elicitadas separadas y lavadas sin afectar a la estructura de las membranas de las células, a un secado controlado de manera que no se afecte básicamente a la barrera de la membrana (temperatura de secado inferior al 50 °C, contenido en agua de las células de al menos un 3 %, por ejemplo de un 5 a un 15 %), y a continuación a un homogenado. Esto permite la ruptura de las células (membranas, citoplasma y vacuolas) después de la etapa de homogenado, con el fin de asegurar la liberación de las fitoalexinas en esta etapa.
- La etapa de homogenado y/o la etapa de secado (en particular controlada) y/o la etapa de lavado y/o la etapa de separación de las células indiferenciadas se realizan de forma ventajosa en presencia de uno o varios agentes antioxidantes, tales como vitamina E, etc., para evitar o reducir toda oxidación de uno o de varios componentes de las células (por ejemplo de la membrana).
- Preferentemente, las células se elicitan en su medio de cultivo *in vitro* por medio de un agente, que después de la extracción de las células elicitadas no se vuelven a encontrar en el homogenado de células elicitadas.
- De forma ventajosa, en el procedimiento de acuerdo con la invención, se controla la etapa de elicitación de dichas células vegetales diferenciadas en su medio de cultivo *in vitro*, con el fin de obtener un medio que contiene al menos un 0,1 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células indiferenciadas, en particular al menos un 0,2 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células, preferentemente al menos un 0,5 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células.
- El medio u homogenado tiene su origen en el cultivo de células vegetales indiferenciadas, elicitadas en el medio de cultivo *in vitro*, a continuación secadas de forma ventajosa, de las especies *Salvia*, *Coleus*, *Rosmarinus*, *Ginkgo*, *Cannabis*, *Colchicum*, *Gloriosa*, *Asparagus*, *Arganier*, *Glycine*, *Medicago*, *Mungo*, *Erythrina*, *Oenothera*, *Papaver*, *Atropa*, *Datura*, *Solanum*, *Borago*, *Reseda*, *Amsonia*, *Catharantus*, *Pilocarpus*, *Digitalis*, *Coffea*, *Theobroma*, *Jasminum*, *Capsicum*, *Iris*, *vigne*, *taxus*, *séquoia*, *chlorophytum*, *Cacao*, *psoralea coryifolia*, *vitex negundo*, *commiphora wighii*, *eucalyptus punctata*, *lavandula angustifolia*, *citrus limon*, *vanilla planifolia*, *marrubium vulgare*, *pilocarpus jaborandi*, *roses*, *betula*, *thé*, y las mezclas de células de dichas especies.
- Por otra parte, se proporciona un ejemplo de preparación de homogenado que se puede usar de acuerdo con la invención en los ejemplos.

La cantidad de homogenado presente en la composición de acuerdo con la invención es por supuesto función del efecto deseado y por lo tanto puede variar en gran medida. Para proporcionar un orden de magnitud, se puede usar un homogenado tal como se ha definido anteriormente en una cantidad que representa de un 0,01 % a un 20 % del peso total de la composición y preferentemente en una cantidad que representa de un 0,1 % a un 5 % del peso total de la composición.

El homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro*, en particular para favorecer la producción de una o de varias fitoalexinas, se usa por ejemplo como agente oxidante, agente anti-radicales, agente calmante, agente anti-irritante, agente neutralizador de radicales.

En un aspecto en particular, el procedimiento de la invención permite la obtención de un homogenado rico en flavonoides tales como los flavanoles, los antocianos y los flavonoles.

En otro aspecto en particular, el procedimiento de la invención permite la obtención de un homogenado rico en compuestos no flavonoides tales como los fenoles ácidos, derivados del ácido benzoico pero además compuestos originales como los estilbenos, los isómeros trans- y cis- del resveratrol y sus glucósidos, los trans- y cis-picéidos.

En otro aspecto en particular de la invención, el homogenado rico en polifenoles, fitoalexinas y metabolitos secundarios podría retener sus efectos farmacológicos importantes. Por lo tanto, los homogenados de la invención presentan uno o varias actividades elegidas entre antioxidante, anti-radicales, antiinflamatoria, anti-proliferativa, relajante, vascular, etc.

Al contrario que los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios tales como los polifenoles se acumulan en la planta *in vivo* en una cantidad baja. En un aspecto de la invención con el fin de obtener estos metabolitos secundarios en una cantidad importante y de forma continua y estable, hemos estimulado su biosíntesis en cultivos de células estandarizadas.

En particular, de acuerdo con la invención, se usan células vegetales indiferenciadas que provienen de vegetales de los géneros secuoya, vid, argania, cacao y chlorophytum, y combinaciones de los mismos.

Por supuesto, los homogenados de células vegetales indiferenciadas que se pueden usar en la composición de acuerdo con la invención pueden provenir de mezclas de células vegetales indiferenciadas obtenidas a partir de géneros vegetales diferentes y/o obtenidas a partir de material vegetal diferente, siendo elicitadas dichas células en un mismo medio de cultivo *in vitro* o en medios de cultivo *in vitro* diferentes (por ejemplo realizar elicitaciones diferentes).

Por composición de uso tópico se refiere a cremas, pomadas, lociones, suspensiones, barras, champús, geles, soluciones (por ejemplo aplicadas por pulverización). La composición de uso tópico es por ejemplo una composición cosmética, dermatológicas, una composición para la higiene de la piel, un perfume, etc.

Preferentemente, de acuerdo con la invención, la composición es una composición cosmética, particularmente de aplicación tópica.

Además, la presente invención tiene como objeto un procedimiento para el tratamiento cosmético de la piel, caracterizado por el hecho de que se aplica sobre la piel, sobre los cabellos, y/o sobre las mucosas, una composición de acuerdo con la invención que comprende al menos un homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro*, liofilizadas e incorporadas o dispersas en un producto cosmético.

El procedimiento para el tratamiento cosmético de la invención se puede poner en práctica en particular mediante la aplicación de las composiciones cosméticas tal como se han definido anteriormente, de acuerdo con la técnica de uso habitual de estas composiciones. Por ejemplo: aplicación de cremas, geles, de sueros, lociones, leches, champús o composiciones anti-solares sobre la piel.

Las características esenciales de las composiciones de acuerdo con la invención, los procedimientos de acuerdo con la invención, y los homogenados de acuerdo con la invención se proporcionan en las reivindicaciones. Los ejemplos de composiciones que siguen a continuación ilustran la intervención sin limitarla en modo alguno. En las composiciones, las proporciones indicadas son porcentajes en peso. En estos ejemplos, se ha usado un procedimiento preferente tal como se define en resumen de aquí en lo sucesivo.

Procedimiento obtención de un homogenado

Etapa 1: Preparación de células indiferenciadas y cultivadas en un medio de cultivo *in vitro*

Etapa 2: Elicitación de las células indiferenciadas en el medio de cultivo

Etapa 3: Extracción de las células indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro*, por ejemplo por filtración del medio de cultivo seguido de una o varias etapas de lavado, realizadas en particular para no destruir la estructura de las membranas de las células. Las células se lavan de forma ventajosa para eliminar básicamente toda traza de medios de cultivo, realizándose esté lavado de forma que no se destruya la estructura de la membrana de las células.

Etapa 4: Secado o liofilización de las células indiferenciadas y elicitadas en el medio de cultivo *in vitro*, realizándose esta operación de secado de forma ventajosa para no destruir la estructura de las membranas de las células. Esta etapa se realiza de forma ventajosa a una temperatura inferior a 60 °C, por ejemplo entre -60 °C y 50 °C.

Etapa 5: homogenado (la etapa 5 se realiza de forma ventajosa, sin embargo en determinados casos, esta etapa puede resultar no necesaria). Por consiguiente, el homogenado contiene básicamente todos los compuestos secos que forman la célula, es decir, básicamente todos los compuestos de la membrana, del citoplasma y de las vacuolas.

Etapa 6: mezcla y/o incorporación a uno o varios excipientes y/o a otros principios activos (en particular otras células/homogenados vegetales) para la preparación de la composición de uso tópico

Ejemplo 1 Realización de un homogenado de células indiferenciadas y elicitadas *in vitro* de vid.

La primera etapa para el desarrollo de cultivos celulares vegetales consiste en seleccionar la planta que produce las sustancias buscadas. En la actualidad, se admite que en el seno de una misma especie, existe una variabilidad de las capacidades de producción de un metabolito dado, en parte de origen genético. Cuando sea posible, se explotará por lo tanto esta variabilidad mediante la selección del mejor genotipo, es decir el más productivo para el metabolito buscado. A partir de fragmentos asépticos de un órgano de una planta seleccionada (hoja, tallo, raíz, etc.), colocados *in vitro* sobre un medio sólido (agar), se consigue inducir proliferaciones primarias. Por lo tanto, después de algunas semanas de puesta en cultivo, se forman, a nivel de los estantes, grupos celulares indiferenciados, denominados callos. El crecimiento de estos callos se mantendrá mediante subcultivos sucesivos en un medio nutritivo nuevo. A continuación, las condiciones de cultivo van a inducir la aparición espontánea de una variabilidad morfológica y metabólica entre callos de la misma planta o del mismo explante. Sin embargo, el mantenimiento de las condiciones ambientales constantes tiende a disminuir esta variabilidad. Por lo tanto, después de uno a dos años de subcultivos regulares, se obtiene una colección de cepas estables que presentan características de crecimiento y de producción de metabolitos muy diferenciados.

En esta etapa, entonces es posible seleccionar, usando ensayos bien definidos, la o las cepas que producen los compuestos de interés en grandes cantidades. El paso de estos callos en medio líquido permite a continuación dirigirse hacia volúmenes de producción más grandes, en primer lugar en matraces de 250 ml, y a continuación en bio-reactor (20 litros o superior). Las suspensiones celulares obtenidas de este modo, formadas por agregados y por células aisladas, aún pueden presentar una heterogeneidad (variabilidad somaclonal). A continuación, se realiza una selección adicional para obtener líneas celulares altamente productivas. Como complemento de esta clonación, la producción de metabolitos de interés para su optimización del mismo modo mediante la modificación de las condiciones de cultivo que conducen a la elaboración de medios, denominados medios de producción. Este medio es idéntico al medio de mantenimiento de las células a excepción de la concentración de sacarosa que se multiplica por dos. Durante su cultivo en un medio de producción, las líneas celulares altamente productivas de cepa de Vid de tipo Cabernet Sauvignon se elicitan 10 días después de la inoculación, mediante luz UV a 254 nm usando una lámpara Wilber-Lourmat T-30C (600 $\mu\text{W}/\text{m}^2$), colocada a una distancia de 1 m con iluminación directa por encima de las células durante 10 minutos, lo que conduce a una acumulación considerable de poli fenoles, en particular estilbenos, en las células. Este medio de elicitación evidentemente no forma ninguna impureza en el cultivo celular. Al final del cultivo, es decir tres días después de la elicitación, las células vegetales se filtran para eliminar el medio de cultivo restante y se aclaran con agua fría (4 °C). De este modo se obtiene una biomasa fresca de aproximadamente 350 gramos por litro de cultivo. A continuación, las células extraídas se secan y se homogeneizan. Se realizó secado más o menos importante con el fin de obtener el homogenado de células de Vid indiferenciadas y elicitadas *in vitro*, en forma de una suspensión viscosa o de un gel o de un polvo básicamente seco. Al controlar la velocidad de secado y el contenido en agua de las células, de forma ventajosa entre un 3 y un 10 %, es posible no destruir la membrana de las células antes de la etapa de homogenado, lo que permite que las fitoalexinas contenidas en las células, en particular en las vacuolas de las células y/o en la membrana, se liberen en el momento de la etapa de homogenado. En el caso de células básicamente secas, se obtienen, después de liofilización usando un aparato Virtis (Uni-Trap 10-100), aproximadamente 20 gramos de biomasa seca por litro de cultivo. El polvo obtenido después del homogenado usando un homogeneizador de tipo Mortier, es ligero, ultrafino (tamaño de las partículas inferior a 10 μm) y de color beige - claro.

Las células elicitadas y secadas se homogeneizan para formar partículas que presentan un tamaño de partícula medio (en peso) comprendido entre 1 y 10 μm . es posible, si fuera necesario, someter al homogenado a una separación granulométrica (tamiz, etc.) para no conservar más que las partículas con un intervalo de tamaño de partícula determinado, por ejemplo en el intervalo de 5 - 10 μm , 1-5 μm , inferior a 3 μm , etc.

Las células indiferenciadas se prepararon a partir de materias diversas y se elicitaron por medio de agentes diversos. Estos datos se muestran en la tabla que sigue a continuación:

Ejemplo 1 (vid)	Materia de la que provienen las células indiferenciadas	Tipo de elicitación
1A	rama de menos de un año de edad	radiación UV durante 3 días
1B	cutícula de uva madura	gas carbónico durante 24 horas
1C	cutícula de uva verde	gas carbónico durante 2 días
1D	pepita de uva	radiación UV et gas carbónico durante 5 días
1E	raíz	radiación UV durante 12 horas
1F	hoja verde	radiación UV durante 15 horas
1G	brote	radiación UV durante 75 horas
1H	residuo de una etapa de prensado	radiación UV durante 2 días
1I	residuo de una etapa de prensado	radiación UV durante 3 días

- 5 Además, se observará que es interesante realizar la operación de homogenado de células indiferenciadas y elicitadas en presencia de uno o de varios agentes o excipientes de la composición cosmética con el fin de asegurar la liberación de las fitoalexinas en al menos, determinados agentes de la composición cosmética.

10 Ejemplo 2 Determinación por HPLC del contenido en estilbenos en las células de vid elicitadas (ejemplo 1A) y no elicitadas.

Materiales y métodos:

- 15 - Bomba Bischoff Modelo 2.200
 - Inyector automático Alcot Model 788 automuestreador
 - Columna Ultrasep C18 (30 cm x 0,18 cm) 6 mm de porosidad
 - Detector de fluorescencia, Jasco 821-FI

20 La detección de la fluorescencia se realizó con una excitación a 300 nm y una emisión a 390 nm. El eluyente usado está formado por metanol: agua, 40:60 (v/v) cuyo pH 8,3 se ajustó con KOH 1 M.

Resultado:

25 El contenido de estilbenos es de aproximadamente un 1 % con respecto al peso de materia seca de las células de Vid elicitadas *in vitro*. El contenido de fitoalexinas permanece inferior a un 0,05 % en las células no elicitadas. Este contenido elevado de estilbeno (20 veces más) es un medio de control de la etapa de elicitación, y por lo tanto del procedimiento de fabricación de un homogenado de acuerdo con la invención. A la vista de la concentración elevada de estilbeno en el homogenado de acuerdo con la invención, es posible, mediante procedimientos de extracción, de destilación, de cristalización, etc. producir medios todavía más concentrados en estilbenos o fitoalexinas, incluso producir fitoalexinas básicamente puras.

30 Las composiciones de acuerdo con la invención presentan por lo tanto una relación de contenido en fitoalexinas/contenido de membrana celular homogenada importante respecto a la relación de fitoalexinas/contenido de membrana celular homogenada para las células vegetales no elicitadas y/o naturales.

35 Ejemplo 3 Actividad farmacológica de un homogenado de vid : antioxidante

La actividad anti-radicales del producto obtenido de acuerdo con el ejemplo 1A se estudió *in vitro*. Dos inventores han usado un modelo de epidermis reconstituidas SKINETHIC®, que permiten revelar esta actividad por dosificación de malondialdehído (MDA), después de su inducción por los rayos ultravioleta B.

40 Distribución de epidermis

45 El ensayo se realizó por triplicado, después de 24 horas de contacto del producto (homogenado del ejemplo 1A) con las epidermis. Queratinocitos de origen humano se siembran en filtros de policarbonato de 0,63 cm² en un medio definido (modificado con MCDB 153) y complementado. Las células se cultivan durante 14 días, en la superficie de contacto aire/líquido, cambian dos en medio de cultivo cada dos días.

Las epidermis formadas de este modo se usaron para la realización del estudio a partir del 17º día del cultivo.

Lotes de epidermis reconstituidas SKTIVETHIC®:

- 5 - Lote 1 : 3 epidermis de control que no reciben ni producto ni irradiación
- Lote 2 : 3 epidermis irradiadas con UVB (150 mJ/cm²)
- Lote 3 : 3 epidermis tratadas con SOD + Catalasa + UVB (150 J/cm²)
- Lote 4 : 3 epidermis tratadas con homogenado (0,1 %)
- Lote 5 : 3 epidermis tratadas con homogenado (0,5 %)
- 10 - Lote 6 : 3 epidermis tratadas con homogenado (1 %)
- Lote 7 : 3 epidermis tratadas con homogenado (0,1 %) + UVB (150 mJ/cm²)
- Lote 8 : 3 epidermis tratadas con homogenado (0,5 %) + UVB (150 mJ/cm²)
- Lote 9 : 3 epidermis tratadas con homogenado (1 %) + UVB (150 mJ/cm²)

15 Dosificación del malondialdehído (MDA) : índice de lipoperoxidación

Extracción del malondialdehído (MDA)

20 24 horas después del tratamiento de las epidermis reconstituidas SKINETHIC®, las células se pusieron en suspensión en:

- 250 µl de tampón Tris 50 mM, pH 8 que contiene NaCl 0,1 M; EDTA 20 mM
- 25 µl de SDS al 7 %
- 300 µl de HCl (0,1 N)
- 25 - 38 µl ácido fosfotúngstico al 1 % en agua
- 300 µl ácido tiobarbitúrico al 0,67% en agua

30 Después de 1 horas de incubación en la oscuridad a 50 °C y una refrigeración en agua con hielo, se añadieron 300 µl de n-butanol en cada tubo. Éstos se centrifugaron a 10 000 g ha 0 °C durante 10 minutos. La fase superior se recuperó para la dosificación del MDA.

Dosificación del malondialdehído (MDA)

35 El MDA se dosificó por medida de la fluorescencia después de separación del complejo MDA-TBA por HPLC.

- Bomba Bischoff Modelo 2.200
- Inyector automático Alcot Model 788 con automuestreador
- Columna Ultrasep C 18 (30 cm x 0,18 cm) 6 mm de porosidad
- Detector de fluorescencia, Jasco 821-FI

40 La detección de la fluorescencia se realizó con una excitación a 515 nm y una emisión a 553 nm. El eluyente usado está formado por metanol: agua, 40:60 (v/v) cuyo pH 8,3 se ajustó con KOH 1 M.

45 La cuantificación se realizó con respecto a patrones tratados como las muestras (0,125; 0,25; 0,5 y 1 µM) usando un software informático ICS (Pic 3) (Servicio de Instrumentación Consumible).

Dosificación de las proteínas

50 La dosificación de las proteínas se realizó de acuerdo con el método de BRADFORD. El aumento de la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de las proteínas determinadas usando un espectrofotómetro UNICAM 8625.

Resultados

55 Dosificación del malondialdehído (MDA) en el homogenado celular.

Los resultados se agrupan en la tabla que sigue a continuación:

	MDA (µM/mg de proteínas)	Variación del MDA (en %) con respecto al control
Control	546 ± 40,81	-
homogenado (0,1 %)	445, ± 6 57,72*	- 18 (disminución)
homogenado (0,5 %)	409,5 ± 48,58*	- 25 (disminución)
homogenado (1 %)	325,5 ± 28,85*	- 40 (disminución)

* Significativamente diferente con respecto al control: p < 0,005 (Ensayo de Wilcoxon de Rangos con Signo).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una protección del homogenado significativa hacia la lipoperoxidación fisiológica con las diluciones de un 0,1; un 0,5 y un 1 % respectivamente de un 18 %, un 25 % y un 40 %.

Lipoperoxidación provocada

5 Los resultados se agrupan en la tabla que sigue a continuación:

	MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteínas)	Variación del MDA (en %) con respecto al control con UVB
Control	546 \pm 40,81	-
UVB (150 mJ/cm^2)	792,4 \pm 59,4	(aumento de un 45 % con respecto al control sin UVB)
SOD/Catalasa + UVB (150 mJ/cm^2)	482,5 \pm 22,1	-39 (disminución)
homogenado (0,1 %) + UVB (150 mJ/cm^2)	545 \pm 43,4**	-31 (disminución)
homogenado (0,5 %) + UVB (150 mJ/cm^2)	485,5 \pm 35,6**	-39 (disminución)
homogenado (1 %) + UVB (150 mJ/cm^2)	420,3 \pm 46,3*	-47 (disminución)
* Significativamente diferente con respecto al control $p < 0,005$ (Ensayo de Wilcoxon de Rangos con Signo). ** Significativamente diferente con respecto al control $p \leq 0,05$ (Ensayo de Wilcoxon de Rangos con Signo).		

10 Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una protección significativa del homogenado hacia la lipoperoxidación provocada por los rayos ultravioleta B (150 mJ/cm^2) a las concentraciones de un 0,1; un 0,5 y un 1 % respectivamente de un 31 %, un 39 % y un 47 % en comparación con las enzimas protectoras SOD/catalasa (39 %).

15 En las condiciones experimentales usadas, el homogenado parecía tener una actividad anti-radicales significativa a nivel de las epidermis reconstituidas SKIMETHIC® después de 24 horas de contacto. Esta actividad se ha puesto de manifiesto mediante la dosificación del MDA.

20 En efecto, las dosificaciones del MDA muestran que el homogenado estudiado a las concentraciones de un 0,1; un 0,5 y un 1 %:

- disminuye significativamente la tasa de MDA fisiológico respectivamente de un 18 %, un 25 % y un 40 %.
- protege significativamente las células contra la lipoperoxidación provocada por los rayos ultravioleta B (UVB 150 mJ/cm^2) disminuyendo la tasa de MDA inducida de un 31 %, un 39 % y un 47 % en comparación con la SOD-catalasa que disminuye la tasa de MDA de un 39 %.

30 En conclusión, el homogenado presenta un efecto anti-radicales tanto en las condiciones fisiológicas como en las condiciones de inducción por las radiaciones ultravioleta B. Queda claro a partir de este ensayo que el homogenado presenta un efecto anti-radicales significativo.

Teniendo en cuenta el modelo elegido (epidermis reconstituida), ya se puede considerar el uso de homogenado en preparaciones de uso tópico con la dosis mínima activa de un 0,1 %.

Ejemplo 4 Búsqueda del efecto de los productos sobre la tasa de respiración (consumo de oxígeno en nanoátomo de oxígeno por millón de células y por minuto)

35 Este experimento se realizó de acuerdo con 2 condiciones diferentes:

- Efecto sobre la velocidad de respiración basal celular al nivel de las células no permeabilizadas así en presencia de glucosa para evaluar la respiración celular.
- Efecto sobre la velocidad de la respiración de las células permeabilizadas en presencia del sustrato respiratorio, piruvato-malato, para evaluar la respiración mitocondrial.

45 Este estudio se realizó sobre queratinocitos humanos en cultivo disociados con tripsina. De 5 a 10 millones de queratinocitos en cultivo se pusieron en suspensión en 1 ml de medio de Hanks-Hepes a 30 °C que contiene glucosa (20 mM). La respiración se controló a tiempo real y se expresó en nanoátomos de oxígeno consumidos por minuto y por 10^6 células. La adición de diferentes cantidades del producto en la cubeta del oxígrafo permitió poner en

evidencia una estimulación eventual o inhibición de la respiración.

La cantidad de oxígeno disuelto en un medio de incubación se determinó usando un electrodo de Clark. El oxígeno que se difunde a través de una película de teflón se reduce a nivel del cátodo de platino polarizado a -0,8 Volt. En estas condiciones, la corriente que pasa entre este cátodo y el ánodo de plata es proporcional a la concentración de oxígeno en la solución. El puente iónico no proporciona una solución de KCl semisaturada. La adquisición y el tratamiento de las medidas se realizan sobre un micro-ordenador.

- Efecto sobre la velocidad de la respiración basal celular

Este ensayo se realizó en células enteras no permeabilizadas en presencia de glucosa.

Los ensayos se realizaron a partir de una solución madre del producto a un 0,3 %.

Los resultados se agrupan en la tabla que sigue a continuación:

Velocidad de la respiración basal celular

homogenado (µl de producto)	0,00	2	5	10	50	100
Respiración basal (nátomos/minuto/ 10 ⁶ cél.) (n = 3)	1,15 ± 0,5	1,22 ± 0,21	1,31 ± 0,14	1,58 ± 0,64	2,30 ± 0,27	2,58 ± 0,21
% de la respiración celular basal	100	106	114	137	200	224

- Efecto sobre la velocidad de la respiración mitocondrial

Este ensayo se realizó sobre las células permeabilizadas en presencia de sustrato respiratorio, piruvato-malato.

Los resultados se agrupan en la tabla que sigue a continuación.

Velocidad de la respiración mitocondrial en presencia de piruvato-malato.

Homogenado (µl de producto)	0,00	2	5	10	50	100
Respiración de piruvato (nátomos/minuto/ 10 ⁵ cél.) (n = 3)	1,58 ± 0,12	1,98 ± 0,05	2,05 ± 0,14	2,25 ± 0,42	2,58 ± 0,22	3,02 ± 0,38
% de la respiración de piruvato	100	125	130	142	163	191

Los resultados muestran que el homogenado, a diferentes dosis, aumenta la velocidad de la respiración (consumo de oxígeno) tanto a nivel de las células enteras no permeabilizadas (en presencia de glucosa), lo que se traduce en un aumento de la respiración basal celular, como a nivel de las células permeabilizadas (en presencia del piruvato-malato), lo que se traduce en un aumento de la respiración mitocondrial.

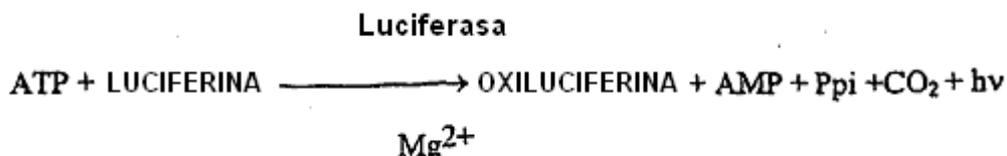
Ejemplo 5 Búsqueda del efecto del producto sobre la velocidad de síntesis de ATP en moles por millón de células y por minuto.

Esta etapa se realizó de acuerdo con 2 condiciones diferentes:

- Efecto sobre la velocidad de síntesis del ATP a nivel de las células no permeabilizadas y en presencia de glucosa para evaluar la velocidad de síntesis celular.
- Efecto sobre la velocidad de síntesis del ATP a nivel de las células permeabilizadas en presencia de sustrato respiratorio, piruvato-malato, para evaluar la velocidad mitocondrial.

Este estudio se realizó sobre queratinocitos humanos en cultivo disociados con tripsina. De 5 a 10 millones de queratinocitos en cultivo se pusieron en suspensión en 1 ml de medio de Hanks-Hepes a 30 °C que contiene glucosa (20 mM). La adición de diferentes cantidades del producto en la cubeta permitió poner en evidencia una estimulación eventual o inhibición de la velocidad de síntesis del ATP.

La cantidad de ATP presente en el medio se determinó gracias a la reacción enzimática siguiente:



La reacción se realiza en un aparato de tipo Luminoscan usando el reactivo para el control del ATP (Kit HS II para Ensayo de Bioluminiscencia de ATP) de Boehringer Mannheim.

5 La intensidad de la luz liberada durante esta reacción se midió con un luminómetro (Luminoscan) que la transcribió en RLU (unidad relativa de luminosidad). Las RLU medidas se convirtieron en moles de ATP con referencia a una gama estándar de ATP.

10 - Efecto sobre la velocidad de síntesis del ATP : tasa de síntesis celular basal

Este ensayo se realizó sobre células enteras no permeabilizadas en presencia de glucosa. Los resultados se agrupan en la tabla que sigue a continuación.

Velocidad de síntesis de ATP

HOMOGENADO (µl de producto)	0.00	2	5	10	50	100
Velocidad de síntesis (nmoles de ATP/mn/10 ⁶ cél.) (n = 3)	2,58 ± 0,15	2,65 ± 0,12	3,08 ± 0,22	3,12 ± 0,30	5,80 ± 0,95	5,95 ± 0,72
% de síntesis celular	100	103	119	121	225	231

15 - Efecto sobre la velocidad de síntesis del ATP mitocondrial

Velocidad de síntesis de ATP mitocondrial en presencia de piruvato-malato.

HOMOGENADO (µl de producto)	0,00	2	5	10	50	100
Velocidad de síntesis (nmolesATP/mn/10 ⁶ cél.) (n = 3)	4,15 ± 0,22	4,95 ± 0,16	4,95 ± 0,18	5,02 ± 0,16	5,75 ± 0,28	7,58 ± 0,85
% de síntesis mitocondrial	100	119	119	121	139	183

20 Los resultados muestran que el homogenado, a diferentes dosis, aumenta la velocidad de síntesis de ATP tanto a nivel de células enteras no permeabilizadas (en presencia de glucosa), que se traduce en un aumento de la síntesis de ATP celular, como al nivel de las células permeabilizadas (en presencia de piruvato-malato) que se traduce en un aumento de la síntesis mitocondrial.

25 Ejemplo 6 Búsqueda del efecto del producto sobre el metabolismo energético de las células en cultivos, Dosificación de los nucleótidos adenílicos celulares (ATP, ADP y AMP) en nmoles/mg de proteínas, y cálculo de la carga energética (CE) de las células tratadas 5 días con el producto.

30 Los queratinocitos humanos se pusieron en cultivo durante 5 días en ausencia y en presencia del producto (10⁷ células por medida).

Una vez tripsinadas, las células se cosecharon y las concentraciones de los nucleótidos Adem y Lycos des nucleótidos adenílicos se determinaron por HPLC.

35 Este ensayo se realizó sobre células enteras no permeabilizadas.

Los resultados se agrupan en la tabla que sigue a continuación.

Dosis	[ATP]	[ADP]	[AMP]	[ATP/ADP]	Suma	C.E.
control	4222	1014	748	4,16	5984	0,79
0,02 %	4532	1435	837	3,16	6804	0,77
0,05 %	5292	1327	779	3,99	7398	0,80
0,1 %	6184	1231	796	5,02	8211	0,83

Dosis	[ATP]	[ADP]	[AMP]	[ATP/ADP]	Suma	C.E.
0,5 %	6848	2195	978	3,12	10021	0,79
1 %	7791	2532	1131	3,08	11454	0,79

Las concentraciones de ATP, ADP y AMP se expresan en nmoles/mg de proteínas (n = 3).

$$\text{Suma} = [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]$$

$$\text{Carga energética (C.E.)} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]}{([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}])}$$

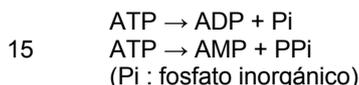
5

Los resultados muestran que el homogenado, a diferentes dosis, aumenta de una forma dependiente de la dosis:

- la concentración de del ATP sintetizado,
- la concentración total de nucleótidos adenílicos celulares.

10

Además, la carga energética (CE) permaneció constante, lo que se traduce en un equilibrio energético estable entre los nucleótidos adenílicos:



Estos resultados están en correlación perfecta con los obtenidos en el transcurso de las 2 primeras etapas, y confirman bien que el producto provoca una estimulación del metabolismo energético celular.

20

Ejemplo 7 Estudio de la tolerancia de un homogenado de vid

Un estudio de tolerancia cutánea y ocular *in vitro* se realizó a título preliminar para el desarrollo de preparaciones cosméticas.

25 Estos ensayos pusieron de manifiesto una tolerancia local perfecta (cutánea y ocular) del homogenado a la concentración de un 0,3 %.

Los homogenados de células se pueden usar directamente para formar composiciones cosméticas de uso tópico. A continuación se proporcionarán algunos ejemplos, no limitantes, de dichas composiciones de uso tópico

30 Ejemplo 8 Dispersión de células de vid elicidadas y enteras en una base cosmética

Las células de vid se obtienen tal como se ha descrito los ejemplos 1A a 1I. Las células de estos ejemplos se usaron separadamente o en mezcla para la preparación de una composición cosmética. Las células se dispersan después de liofilización sin que se hayan homogeneizado en la base siguiente:

35

- Agua desionizada al 85,61 %
- Aceite mineral al 9,00 %
- Alcohol cetílico al 3,00 %
- cetearéth - 20 al 0,75 %
- 40 - células de vid al 0,20 %
- aroma al 0,15 %
- carbómero al 0,10 %
- metilcloroisotiazolina
- 45 - y metilisotiazolina [kathon CG] al 0,065 %
- hidróxido sódico (45 %) al 0,06 %
- hidroxianisol butilado al 0,06 %

TOTAL 100,00 %

50 La composición obtenida muestra una dispersión homogénea de células en la crema y un tamaño de partícula muy fino. El estudio de limpieza mostró ausencia de gérmenes y hongos así como una notable estabilidad de la composición. El resultado obtenido, que se había sometido a ensayo en un estudio transcutáneo, permitió observar el paso de los principios activos, en particular los polifenoles a través del tejido cutáneo.

55

Ejemplo 9 Dispersión de células de vid elicidadas y homogenadas en una base cosmética

Las células de vid se obtienen tal como se ha descrito los ejemplos 1A a 1I. Las células de estos ejemplos se usaron separadamente o en mezcla para la preparación de una composición cosmética. Las células se dispersan después de liofilización y homogenado en la base siguiente:

- 5 - Agua desionizada al 85,61 %
- Aceite mineral al 9,00 %
- Alcohol cetílico al 3,00 %
- 10 - cetearéth - 20 al 0,75 %
- células de vid al 0,20 %
- aroma al 0,15 %
- carbómero al 0,10 %
- metilcloroisotiazolina
- 15 y metilisotiazolina [kathon CG] al 0,065 %
- hidróxido sódico (45 %) al 0,06 %
- hidroxianisol butilado al 0,06 %

TOTAL 100,00 %

La composición obtenida muestra una dispersión homogénea del homogenado de células en la crema y un tamaño de partícula muy fino. El estudio de limpieza mostró ausencia de gérmenes y hongos así como una notable estabilidad de la composición. El resultado obtenido, que se había sometido a ensayo en un estudio transcutáneo, permitió observar el paso de los principios activos, en particular los polifenoles a través del tejido cutáneo.

Ejemplo 10 Dispersión de células de vid elicidadas y enteras en una base cosmética

Las células de vid se obtienen tal como se ha descrito los ejemplos 1A a 1I. Las células de estos ejemplos se usaron separadamente o en mezcla para la preparación de una composición cosmética. Las células se dispersan después de liofilización sin que se hayan homogeneizado en la base siguiente:

- agua al 46,89 %
- laureth sulfato sódico (25 %) al 36,40 %
- 35 - PEG-7 cocoato de glicerilo al 2,00 %
- laureth-2 al 1,50 %
- laureth-11 carboxilato sódico al 4,00 %
- cocamidopropil betaína y ácido benzoico al 3,48 %
- cloruro sódico al 1,60 %
- propilenglicol al 1,00 %
- 40 - perfume al 0,13 %
- PEG-40 aceite de ricino hidrogenado y propilenglicol y agua al 0,50 %
- oleth-10 al 0,50 %
- fosfato sódico al 0,30 %
- fosfato disódico al 0,08 %
- 45 - ácido cítrico (50 %) al 0,52 %
- benzoato sódico al 0,50 %
- células de vid al 0,20 %
- ácido salicílico al 0,20 %
- fenoxietanol al 0,20 %

TOTAL 100,00 %

La composición obtenida muestra una dispersión homogénea de células en la crema y un tamaño de partícula muy fino. El estudio de limpieza mostró ausencia de gérmenes y hongos así como una notable estabilidad de la composición. El resultado obtenido, que se había sometido a ensayo en un estudio transcutáneo, permitió observar el paso de los principios activos, en particular los polifenoles a través del tejido cutáneo.

Ejemplo 11 Dispersión de células de vid elicidadas y homogenadas en una base cosmética

Las células de vid se obtienen tal como se ha descrito los ejemplos 1A a 1I. Las células de estos ejemplos se usaron separadamente o en mezcla para la preparación de una composición cosmética. Las células se dispersan después de liofilización y homogeneizado en la base siguiente:

- agua al 46,89 %
- 65 - laureth sulfato sódico (25 %) al 36,40 %
- PEG-7 cocoato de glicerilo al 2,00 %

- laureth-2 al 1,50 %
- laureth-11 carboxilato sódico al 4,00 %
- cocamidopropil betaína y ácido benzoico al 3,48 %
- cloruro sódico al 1,60 %
- 5 - propilenglicol al 1,00 %
- perfume al 0,13 %
- PEG-40 aceite de ricino hidrogenado y propilenglicol y agua al 0,50 %
- oleth-10 al 0,50 %
- fosfato sódico al 0,30 %
- 10 - fosfato disódico al 0,08 %
- ácido cítrico (50 %) al 0,52 %
- benzoato sódico al 0,50 %
- homogenado de células de vid al 0,20 %
- ácido salicílico al 0,20 %
- 15 - fenoxietanol al 0,20 %

TOTAL 100,00 %

20 La composición obtenida muestra una dispersión homogénea del homogenado de células en la crema y un tamaño de partícula muy fino. El estudio de limpieza mostró ausencia de gérmenes y hongos así como una notable estabilidad de la composición. El resultado obtenido, que se había sometido a ensayo en un estudio transcutáneo, permitió observar el paso de los principios activos, en particular los polifenoles a través del tejido cutáneo.

25 Ejemplo 12 Cremas

- fase acuosa A : agua desmineralizada asociada a un producto hidratante
- fase oleosa B : emulsionante + emoliente + aceite
- fase C : conservante, perfumes
- fase D : producto activo : homogenado de células de Vid indiferenciadas y elicidadas, en forma de una
- 30 suspensión viscosa o de un gel o de un polvo básicamente seco.

Ejemplo 13 Lociones

35 que contienen solamente una fase acuosa A : agua desmineralizada, propilenglicol, conservante, perfume y producto activo : homogenado de células de Vid indiferenciadas y elicidadas, en forma de una suspensión viscosa o de un gel o de un polvo básicamente seco.

Ejemplo 14 Champús

40 que contienen solamente una fase acuosa A a base de agua desmineralizada, detergentes, agentes espumantes, agentes espesantes, perfume y producto activo : homogenado de células de Vid indiferenciadas y elicidadas, en forma de una suspensión viscosa o de un gel o de un polvo básicamente seco.

45 Ejemplo 15 Geles.

- Se considera que los hidrogeles y los oleogeles, obtenidos por adición de la fase acuosa A o a la fase oleosa B de agentes del tipo emulsionante espesante
- fase C : perfume, conservante
- fase D : homogenado de células de Vid indiferenciadas y elicidadas, en forma de una suspensión viscosa o de un
- 50 gel o de un polvo básicamente seco.

Ejemplo 16 Soluciones

55 Soluciones que contienen solamente una fase acuosa A básicamente a base de agua desmineralizada, perfume, conservante y producto activo : homogenado de células de Vid indiferenciadas y elicidadas, en forma de una suspensión viscosa o de un gel o de un polvo básicamente seco.

Ejemplo 17 Leches

- fase acuosa A : básicamente a base de agua desionizada
- fase oleosa B : aceite + emulsionante + emoliente
- fase C : conservante + producto hidratante
- fase D : producto activo : homogenado de células de Vid indiferenciadas y elicidadas, en forma de una
- 60 suspensión viscosa o de un gel o de un polvo básicamente seco.

65

En los ejemplos que se han proporcionado anteriormente, con respecto a las cremas, geles o leches, las diferentes fases A, B, C y D, en proporciones que pueden variar entre ellas en función de las aplicaciones deseadas, se mezclan en la forma habitual, tal como lo realiza habitualmente el experto en la materia en este campo.

5 Con respecto a las soluciones, soluciones y champús, la composición de uso tópico contienen los diferentes componentes, de modo que se pueden variar los contenidos en función de las aplicaciones, mezclas en la única fase acuosa, tal como lo realiza habitualmente el experto en la materia en este campo.

10 La proporción del homogenado de células de Vid indiferenciadas y elicitadas, en forma de una suspensión viscosa o de un gel o de un polvo básicamente seco es función de la naturaleza de la composición de uso tópico y de la aplicación deseada. Esta comprende de forma ventajosa entre un 0,01 y un 5 %, pero puede alcanzar hasta un 25 %.

15 Evidentemente, la invención no se limita a los ejemplos de realización que se han proporcionado anteriormente y es posible realizar la composición de uso tópico bajo otras formas, tales como aceite, ungüento, lacas, maquillajes (crema de base, polvo, lápiz de labios, lápiz, máscara, sombra de ojos) que entran dentro del alcance de la invención.

20 Del mismo modo, la invención no se limita a las células de Vid y se puede aplicar a otros tipos de células vegetales, dado que se pueden obtener en forma indiferenciada y que pueden experimentar una elicitación que conduce a una acumulación de metabolitos secundarios en cantidad suficiente para permitir la actividad biológica en uso tópico.

En todos los casos, se obtiene la composición de uso tópico que contiene un homogenado de células vegetales indiferenciadas, en forma de una suspensión viscosa o de un gel o de un polvo básicamente seco.

25 Ejemplo 18

30 Se repite el ejemplo 1, usando células vegetales indiferenciadas que provienen de especies vegetales diferentes o de mezclas de especies vegetales diferentes. En estos ejemplos, se usaron cortezas, pepitas o semillas, raíces, hojas, tallos, brotes, frutas, piel o cutícula para obtener células vegetales indiferenciadas.

La tabla siguiente recoge las especies vegetales usadas:

Ejemplo 18	Especies vegetales
A	<i>Rosmarinus</i>
B	<i>Coffea</i>
C	<i>Cacao</i>
D	<i>Mungo</i>
E	<i>Colchicum</i>
F	<i>Jasminum + Iris</i>
G	<i>Capsicum</i>
H	<i>Pilocarpus</i>
I	<i>Sequoia</i>
J	<i>Solanum</i>
K	<i>Chlorophytum</i>
L	<i>Ginkgo</i>
M	<i>digitalis</i>
N	<i>Salvia</i>
O	<i>Taxus</i>
P	<i>Papaver</i>
Q	<i>Salvia + rosmarinus</i>
R	<i>Roses</i>
S	<i>thé</i>

Ejemplo 18	Especies vegetales
T	<i>Bétula</i>
U	<i>Vigne + citrus + ginko</i>

Ejemplo 19 Actividad antioxidante de homogenados de diferentes especies vegetales:

5 La actividad anti-radicales de homogenados obtenidos de diferentes especies vegetales se estudió *in vitro*. Los inventores utilizaron un modelo de epidermis reconstituidas SKINETHIC®, que permite revelar esta actividad mediante la dosificación del malondialdehído (MDA), después de su inducción por los rayos ultravioleta B. las epidermis se trataron para cada especie vegetal mediante una concentración única de homogenado a un 1 %.

10 Lipoperoxidación provocada

Se repitieron las condiciones experimentales del ejemplo 3.

Los resultados se agrupan en la tabla que sigue a continuación:

Especie vegetal, homogenado a un 1 %	Variación del MDA (en %) con respecto al control negativo
Control negativo	-
Control positivo UVB (150 mJ/cm ²)	Aumento de un 45 %
Homogenado de <i>Cacao</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-29 %
Homogenado de <i>Mungo</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-22 %
Homogenado de <i>Colchicum</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-26 %
Homogenado de <i>Jasminum</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-17 %
Homogenado de <i>Capsicum</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-43 %
Homogenado de <i>Pilocarpus</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-41 %
Homogenado de <i>Sequoia</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-59 %
Homogenado de <i>Solanum</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-19 %
Homogenado de <i>Chlorophytum</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-53 %
Homogenado de <i>Ginkgo</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-52 %
Homogenado de <i>Roses</i> a un 1 % + UVB (150mJ/cm ²)	-25 %
Homogenado de <i>Betula</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-30 %
Homogenado de <i>digitalis</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-33 %
Homogenado de <i>Salvia</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-47 %
Homogenado de <i>Taxus</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-56 %
Homogenado de <i>Papaver</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-53 %
Homogenado de <i>Cannabis</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	- 47 %
Homogenado de <i>Rosmarinus</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-27 %
Homogenado de <i>Coffea</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-34 %
Homogenado de <i>Arganier</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-51 %
Homogenado de <i>Catharantus</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-59 %
Homogenado de <i>Iris</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-19 %
Homogenado de <i>Datura</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-53 %
Homogenado de <i>Gloriosa</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-12 %

Especie vegetal, homogenado a un 1 %	Variación del MDA (en %) con respecto al control negativo
Homogenado de <i>Medicago</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-33 %
Homogenado de <i>Asparagus</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-47 %
Homogenado de <i>Borago</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-22 %
Homogenado de <i>Reseda</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-13 %
Homogenado de <i>Amsonia</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-26 %
Homogenado de <i>Erythrina</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-21 %
Homogenado de <i>Coleus</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-53 %
Homogenado de <i>Oenothera</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-17 %
Homogenado de <i>Atropa</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-23 %
Homogenado de <i>Theobroma</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-17 %
Homogenado de <i>Glycine</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-43 %
Homogenado de <i>psoralea corylifolia</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-40 %
Homogenado de <i>vitex negundo</i> a un 1 % + UVB (150 mJ/cm ²)	-42 %
Homogenado de <i>commiphora wighii</i> a un 1 % + UVB 150 J/cm ²	-51 %
Homogenado de <i>vanilla planifolia</i> a un 1 % + UVB (150 J/cm ²)	-14 %
Homogenado de <i>marrubium vulgare</i> a un 1 % + UVB (150 J/cm ²)	-28 %
Homogenado de <i>pilocarpus jaborandi</i> a un 1 % + UVB (150 J/cm ²)	-41 %

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una protección significativa de los homogenados frente a la lipoperoxidación provocada por los rayos UVB (150 mJ/cm²) a concentraciones de 1 %.

- 5 En las condiciones experimentales usadas, parece que los homogenados presentaron una actividad anti-radicales significativa a nivel de las epidermis reconstituidas SKINETHIC® después de 24 horas de contacto. Esta actividad se ha puesto de manifiesto mediante la dosificación del MDA.
- En efecto, las dosificaciones del MDA de los homogenados se estudiaron a concentraciones de un 1 % protegen significativamente las células frente a la lipoperoxidación provocada por los rayos ultravioleta B (UVB 150 mJ/cm²) disminuyendo las tasas de MDA inducidos.

10 En conclusión, los homogenados de las diferentes especies vegetales estudiadas presentan un efecto anti-radicales en las condiciones de inducción por las radiaciones ultravioleta B. De este ensayo se deduce que los homogenados presentan un efecto anti-radicales significativo. Teniendo en cuenta el modelo mantenido (epidermis reconstituida), ya se puede considerar el uso de estos homogenados en preparaciones de uso tópico a la dosis mínima activa de un 0,1 %.

Ejemplo 20

20 Lipoperoxidación provocada

Las condiciones experimentales del ejemplo 3 se repitieron usando la combinación de plantas aromáticas con otras especies. Los resultados se agrupan en la tabla que sigue a continuación:

Especie vegetal, homogenado a un 1 %	Variación del MDA (en %) con respecto al control negativo
Control negativo	-
Control positivo de UVB (150 mJ/cm ²)	Aumento de un 45 %

Homogenado de <i>Jasminum sanbac</i> + <i>Ginko bilboa</i> a un 1 % + UVB 150 mJ/cm ²	-12 %
Homogenado de <i>eucalyptus punctata</i> + <i>psoralea coryfolia</i> a un 1 % + UVB 150 mJ/cm ²	- 21 %
Homogenado de <i>lavandula angustifolia</i> + <i>Vitex negundo</i> a un 1 % + UVB 150 mJ/cm ²	- 17 %
Homogenado de <i>citrus limon</i> + <i>sequoia</i> a un 1 % + UVB 150 mJ/cm ²	- 24 %

Ejemplo 21

5 Se repitieron los ejemplos 1A a 1I excepto en que las células indiferenciadas, elicadas y lavadas se secaron en una atmósfera (por ejemplo de nitrógeno) que presenta una temperatura ambiental de aproximadamente 30 °C, con el fin de reducir el contenido en agua de las células a respectivamente un 5 % en peso, un 10 % en peso y un 15 % en peso. La estructura de la membrana de la célula se conservó de este modo.

10 A continuación se sometió a las células indiferenciadas elicadas, lavadas y secadas a un homogenado.

Ejemplo 22

15 Se repitió el ejemplo 20, excepto en que se mezclaron las células indiferenciadas elicadas, lavadas y secas (con la estructura de la membrana conservada) con uno o varios excipientes y/o compuestos activos de una composición cosmética antes de la etapa de homogenado.

La lista siguiente recoge determinados excipientes mezclados con las células antes de su homogenado.

- 20 - laureth sulfato sódico (solución acuosa por ejemplo al 25 %)
- PEG-7 cocoato de glicerilo
- antioxidante (solución acuosa que contiene vitamina E)
- laureth-2
- laureth-11 carboxilato sódico
- 25 - cocamidopropil betaína
- betaína (glicinabetaína)
- aceite esencial
- propilenglicol
- etanol
- PEG-40 aceite de ricino hidrogenado
- 30 - aceite vegetal (aceite de coco, aceite de oliva, etc.)
- aceite esencial
- mezclas de uno o de varios compuestos, que se ha mencionado anteriormente, entre ellos y/o con agua.

35 La cantidad excipientes y de agua añadidos a las células puede variar por ejemplo entre un 10 % del peso de las células secas a homogeneizar y de un 100 % de dicho peso, incluso más.

40 El uso de uno o de varios agentes tensioactivos con uno o varios agentes antioxidantes parece interesante para facilitar el homogenado de células en particular de la membrana, para facilitar la liberación de fitoalexinas unidas obligadas a una membrana, y para reducir o evitar cualquier problema de degradación de compuestos debido a la humedad. Además es posible extraer este homogenado de las fitoalexinas mediante una etapa de extracción (por ejemplo etapas sucesivas de extracción por medio de etanol y de filtración).

Por lo tanto, este ejemplo es un ejemplo de procedimiento de obtención de fitoalexina(s), en el que:

- 45 - células vegetales indiferenciadas se ponen en un medio de cultivo,
- las células indiferenciadas se elicitan en el medio de cultivo, después y/o durante el cultivo,
- las células indiferenciadas y elicadas se separan del medio de cultivo,
- las células indiferenciadas elicadas se someten posiblemente a uno o varios lavados,
- las células indiferenciadas y elicadas se secan de forma ventajosa, preferentemente se liofilizan,
- 50 - las células indiferenciadas, elicadas se homogeneizan con el fin de formar un homogenado, y
- el homogenado se somete a extracción para extraer una o varias fitoalexinas del homogenado, posiblemente después de una etapa de colocación de las células a un homogenadas en un medio, en particular un medio acuoso y/o alcohólico.

55

Ejemplo 23

5 Se repitieron los ejemplos 1A a 1I, excepto en que las células indiferenciadas y elicitadas se lavaron y se secaron (por medio de una corriente de nitrógeno a 30 °C) para eliminar el agua de lavado presente en el exterior de las membranas de las células y para reducir el contenido de agua presente en las células, respectivamente de un 0 %, un 10 %, un 25 %, un 50 % y un 75 %. A continuación las células se homogenizar. El homogenado obtenido de este modo contiene básicamente todos los compuestos presentes en las células, con un contenido en agua bien reducido, o bien que corresponde al agua presente en las células normales (contenido normal en agua de las células).

10

REIVINDICACIONES

1. Composición para aplicación tópica, en particular composición cosmética, que contiene células vegetales indiferenciadas, **caracterizada por que** la composición contiene al menos un homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas en cultivo *in vitro* de una especie elegida entre *Salvia*, *Coleus*, *Rosmarinus*, *Ginkgo*, *Cannabis*, *Colchicum*, *Gloriosa*, *Asparagus*, *Arganier*, *Glycine*, *Medicago*, *Mungo*, *Erythrina*, *Oenothera*, *Papaver*, *Atropa*, *Datura*, *Solanum*, *Borago*, *Reseda*, *Amsonia*, *Catharantus*, *Pilocarpus*, *Digitalis*, *Coffea*, *Theobroma*, *Jasminum*, *Capsicum*, *Iris*, *vigne*, *taxus*, *séquoia*, *chlorophytum*, *cacao*, *psoralea corylifolia*, *vitex negundo*, *commiphora wighii*, *eucalyptus punctata*, *lavandula angustifolia*, *citrus limon*, *vanilla planifolia*, *marrubium vulgare*, *pilocarpus jaborandi*, *roses*, *betula*, *thé* y las mezclas de células de dichas especies, para sintetizar al menos una fitoalexina, siendo realizada dicha elicitación de forma ventajosa para sintetizar al menos una fitoalexina después de una etapa de cultivos de células vegetales *in vitro* sin elicitación, en la que dicho homogenado contiene al menos una fitoalexina que comprende al menos un 95 %, de forma ventajosa al menos un 97 %, preferentemente al menos un 99 % en peso del conjunto de materias secas originadas en las células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro*, dispersando dicho homogenado en dicha composición o estando bajo una forma apta para su dispersión en dicha composición.
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro* comprende partículas que provienen de las vacuolas, partículas que provienen del citoplasma y partículas que provienen de la membrana pectocelulósica, conteniendo dicho homogenado al menos un 0,1 % en peso de fitoalexina(s).
3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada por que** el homogenado es un homogenado de células indiferenciadas y elicitadas *in vitro*, estando dichas células al menos parcialmente secas.
4. Composición de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** el homogenado es un homogenado de células indiferenciadas y elicitadas *in vitro*, estando dichas células básicamente secas por completo, preferentemente liofilizadas, y a continuación a un homogenadas.
5. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** contiene de un 0,005 a un 25 % en peso, de forma ventajosa de un 0,005 a un 5 % en peso de homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro*, calculando dicho peso en forma seca.
6. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** contiene un homogenado seco o básicamente seco de células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro*, teniendo dicho homogenado seco o básicamente seco un contenido en agua inferior a un 25 % en peso, de forma ventajosa inferior a un 15 % en peso, preferentemente inferior a un 10 % en peso.
7. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada por que** el homogenado tiene un tamaño de partícula medio de las partículas sólidas inferior a 100 μm , de forma ventajosa inferior a 10 μm , preferentemente inferior a 1 μm .
8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada por que** las partículas del homogenado tienen un tamaño de partícula de modo que un 90 % en peso de las partículas tienen un tamaño de partícula comprendido en el intervalo de tamaño de partícula medio de - 25 % hasta un tamaño de partícula medio de + 25 %.
9. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** dicho homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro* contiene al menos una fitoalexina sintetizada mediante la elicitación *in vitro* de las células vegetales indiferenciadas.
10. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** dicho homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas es un homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro* por un agente en el medio de cultivo, estando dicho homogenado básicamente exento de dicho agente después de la elicitación.
11. Composición de acuerdo con la reivindicación precedente, **caracterizada por que** las células indiferenciadas se elicitan *in vitro* por un agente volátil.
12. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** dicho homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro* contiene al menos un compuesto terpénico o tánico o polifenólico, siendo sintetizado dicho compuesto mediante la elicitación *in vitro* de las células vegetales indiferenciadas en su medio de cultivo.
13. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** el homogenado de células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro* se presenta en forma de una suspensión viscosa o de un gel o de un polvo básicamente seco, estando dicha suspensión, gel o polvo de forma ventajosa en

una forma apta para su dispersión en la composición.

14. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** el homogenado de células es un homogenado de células de vid indiferenciadas y elicidadas *in vitro*.

15. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** contiene un homogenado de células indiferenciadas, cultivadas y elicidadas en su medio de cultivo *in vitro*, estando dicho homogenado de forma ventajosa básicamente exento de medios de cultivo.

16. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** contiene un homogenado de células indiferenciadas y elicidadas *in vitro*, conteniendo dicho homogenado al menos un 0,1 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células indiferenciadas elicidadas homogenadas, en particular al menos un 0,2 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células indiferenciadas elicidadas homogenadas, preferentemente al menos un 0,5 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células indiferenciadas elicidadas a un homogenadas.

17. Procedimiento de preparación de una composición de uso tópico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** las células vegetales indiferenciadas de al menos una especie elegida entre *Salvia, Coleus, Rosmarinus, Ginkgo, Cannabis, Colchicum, Gloriosa, Asparagus, Arganier, Glycine, Medicago, Mungo, Erythrina, Oenothera, Papaver, Atropa, Datura, Solanum, Borago, Reseda, Amsonia, Catharantus, Pilocarpus, Digitalis, Coffea, Theobroma, Jasminum, Capsicum, Iris, vigne, taxus, séquoia, chlorophytum, cacao, psoralea coryifolia, vitex negundo, commiphora wighii, eucalyptus punctata, lavandula angustifolia, citrus limon, vanilla planifolia, marrubium vulgare, pilocarpus jaborandi, roses, betula, thé* y las mezclas de células de dichas especies, se ponen en un medio de cultivo con el fin de permitir un crecimiento de las células, **por que** dichas células vegetales diferenciadas se elicitan en su medio de cultivo durante un periodo de tiempo suficiente para la síntesis de una cantidad suficiente de metabolitos, y **por que** las células vegetales elicidadas del medio de cultivo se mezclan con uno o más excipientes para preparar una composición cosmética, homogeneizando las células antes y/o después de su mezcla con uno o varios excipientes y/o antes y/o después de una etapa de secado.

18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado por que** dichas células elicidadas *in vitro* se someten a un secado, seguido de un a un homogenado.

19. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18, **caracterizado por que** las células se elicitan en su medio de cultivo *in vitro* por medio de un agente, que después de la extracción de las células elicidadas del medio de cultivo y conservando la estructura de la membrana de las células no se vuelven encontrar en las células elicidadas.

20. Procedimiento en el que las células vegetales indiferenciadas se ponen en cultivo *in vitro*, se elicitan en el medio de cultivo *in vitro*, se secan, a continuación se homogeneizan (probablemente después de una o varias etapas de lavado/secado) de al menos una especie elegida entre *Salvia, Coleus, Rosmarinus, Ginkgo, Cannabis, Colchicum, Gloriosa, Asparagus, Arganier, Glycine, Medicago, Mungo, Erythrina, Oenothera, Papaver, Atropa, Datura, Solanum, Borago, Reseda, Amsonia, Catharantus, Pilocarpus, Digitalis, Coffea, Theobroma, Jasminum, Capsicum, Iris, vigne, taxus, séquoia, chlorophytum, cacao, psoralea coryifolia, vitex negundo, commiphora wighii, eucalyptus punctata, lavandula angustifolia, citrus limon, vanilla planifolia, marrubium vulgare, pilocarpus jaborandi, roses, betula, thé* y las mezclas de células de dichas especies, y se dispersan en una composición para el tratamiento del cuerpo humano.

21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, **caracterizado por que** las células se secan por liofilización antes de someterlas a un a un homogenado.

22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, **caracterizado por que** se usa un agente o un medio de elicitación que no forma una impureza en el homogenado secado de células indiferenciadas y elicidadas.

23. Procedimiento de obtención de fitoalexina(s), en el que:

- las células vegetales indiferenciadas se ponen en un medio de cultivo de al menos una especie elegida entre *Salvia, Coleus, Rosmarinus, Ginkgo, Cannabis, Colchicum, Gloriosa, Asparagus, Arganier, Glycine, Medicago, Mungo, Erythrina, Oenothera, Papaver, Atropa, Datura, Solanum, Borago, Reseda, Amsonia, Catharantus, Pilocarpus, Digitalis, Coffea, Theobroma, Jasminum, Capsicum, Iris, vigne, taxus, séquoia, chlorophytum, cacao, psoralea coryifolia, vitex negundo, commiphora wighii, eucalyptus punctata, lavandula angustifolia, citrus limon, vanilla planifolia, marrubium vulgare, pilocarpus jaborandi, roses, betula, thé* y las mezclas de células de dichas especies,
- después y/o durante el cultivo, las células indiferenciadas se inducen en el medio de cultivo,
- las células indiferenciadas y elicidadas se separan del medio de cultivo,
- las células indiferenciadas elicidadas se someten probablemente a uno o varios lavados,
- las células indiferenciadas y elicidadas se secan de forma ventajosa, preferentemente se liofilizan,

- las células indiferenciadas, elicitadas con el fin de formar un a un homogenado, se homogeneizan y
- el homogenado se somete a una extracción para extraer una o varias fitoalexinas del homogenado, probablemente después de una etapa de introducción de las células homogenadas en un medio, en particular un medio acuoso y/o alcohólico.

5
24. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, **caracterizado por que** la etapa de elicitación de dichas células vegetales diferenciadas en su medio de cultivo *in vitro* se controla, con el fin de obtener un medio que contiene al menos un 0,1 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células vegetales indiferenciadas y elicitadas, en particular al menos un 0,2 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células.

10
25. Homogenado de células vegetales indiferenciadas de al menos una especie elegida entre *Salvia*, *Coleus*, *Rosmarinus*, *Ginkgo*, *Cannabis*, *Colchicum*, *Gloriosa*, *Asparagus*, *Arganier*, *Glycine*, *Medicago*, *Mungo*, *Erythrina*, *Oenothera*, *Papaver*, *Atropa*, *Datura*, *Solanum*, *Borago*, *Reseda*, *Amsonia*, *Catharantus*, *Pilocarpus*, *Digitalis*, *Coffea*,
15 *Theobroma*, *Jasminum*, *Capsicum*, *Iris*, *vigne*, *taxus*, *séquoia*, *chlorophytum*, *cacao*, *psoralea corylifolia*, *vitex negundo*, *commiphora wighii*, *eucalyptus punctata*, *lavandula angustifolia*, *citrus limon*, *vanilla planifolia*, *marrubium vulgare*, *pilocarpus jaborandi*, *roses*, *betula*, *thé* y las mezclas de células de dichas especies, elicitadas en el medio de cultivo *in vitro*, después secadas, en el que dicho homogenado contiene al menos una fitoalexina que comprende al menos un 95 % en peso, de forma ventajosa al menos un 97 % en peso, preferentemente al menos un 99 % en peso del conjunto de las materias secas que se originan en las células vegetales homogenadas indiferenciadas y elicitadas *in vitro*, estando dicho homogenado en una forma apta para su dispersión en una composición cosmética y/o farmacéutica.

20
26. Homogenado de acuerdo con la reivindicación 25, **caracterizado por que** está exento de agente de elicitación y/o de medio de cultivo.

27. Homogenado de células vegetales de acuerdo con la reivindicación 25 o 26, **caracterizado por que** presenta un tamaño de partícula medio inferior a 10 µm.

30
28. Homogenado de células vegetales de acuerdo con una de las reivindicaciones 25 a 27, **caracterizado por que** contiene al menos un 0,1 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células, en particular al menos un 0,2 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células, preferentemente al menos un 0,5 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células.

35
29. Composición para aplicación tópica, en particular composición cosmética, que contiene células vegetales indiferenciadas, **caracterizada por que** la composición contiene al menos un homogenado que contiene al menos una fitoalexina, comprendiendo dicho homogenado al menos un 95 %, de forma ventajosa al menos un 97 %, preferentemente al menos un 99 % en peso del conjunto de materias secas que se originan en las células vegetales indiferenciadas y elicitadas *in vitro*, en la que el homogenado contiene al menos un 0,1 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células, en particular al menos un 0,2 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células, preferentemente al menos un 0,5 % en peso de estilbenos con respecto al peso seco de las células, siendo dicho homogenado un homogenado de una o de las células vegetales indiferenciadas, elicitadas y después secadas elegidas entre el grupo formado por las especies siguientes: *Salvia*, *Coleus*, *Rosmarinus*, *Ginkgo*,
40 *Cannabis*, *Colchicum*, *Gloriosa*, *Asparagus*, *Arganier*, *Glycine*, *Medicago*, *Mungo*, *Erythrina*, *Oenothera*, *Papaver*,
45 *Atropa*, *Datura*, *Solanum*, *Borago*, *Reseda*, *Amsonia*, *Catharantus*, *Pilocarpus*, *Digitalis*, *Coffea*, *Theobroma*, *Jasminum*, *Capsicum*, *Iris*, *vigne*, *taxus*, *séquoia*, *chlorophytum*, *cacao*, *psoralea corylifolia*, *vitex negundo*, *commiphora wighii*, *eucalyptus punctata*, *lavandula angustifolia*, *citrus limon*, *vanilla planifolia*, *marrubium vulgare*, *pilocarpus jaborandi*, *roses*, *betula*, *thé*, y sus mezclas.