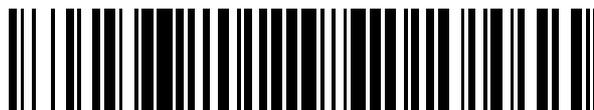


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 869**

51 Int. Cl.:

A61K 36/28 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2011 E 11710252 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2512495**

54 Título: **Procedimiento para obtener un extracto estandarizado de quercetina y 3-O-metilquercetina a partir de flores de marcela (Achyrocline satureioides), y composiciones cosméticas y farmacéuticas que comprenden dicho extracto**

30 Prioridad:

15.12.2009 FR 0959012

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

14.12.2015

73 Titular/es:

**NATURA COSMÉTICOS S.A. (100.0%)
Rodovia Regis Bittencourt, Km 293
06882-700 Itape Cerica da Serra SP, BR**

72 Inventor/es:

**MOURA SA ROCHA, VANESSA DE;
DELARCINA JUNIOR, SERGIO;
FIGUEREDO BEDA, DÉBORA;
LORENCINI, MARCIO;
COSTA BEBER, TIAGO y
PASSERO, ALAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 553 869 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

Procedimiento para obtener un extracto estandarizado de quercetina y 3-O-metilquercetina a partir de flores de marcela (*Achyrocline satureioides*), y composiciones cosméticas y farmacéuticas que comprenden dicho extracto

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un extracto a partir de inflorescencias de marcela (*Achyrocline satureioides*). La presente descripción también se refiere a composiciones cosméticas, farmacéuticas y veterinarias que contienen el susodicho extracto.

La presente descripción también se refiere al uso y al método de aplicación del susodicho extracto de marcela.

Descripción del estado de la técnica

10 *Achyrocline satureioides*, también conocida como marcela, es una planta de la familia *Asteraceae*, que se encuentra en Argentina, Uruguay, Brasil y Paraguay y se usa ampliamente en la medicina tradicional. Es una planta anual, de altura media y con inflorescencias amarillas, comúnmente encontrada en Brasil, principalmente en los estados de la región del sur (Marques, 1995; Marques & Barros, 2000). Se puede propagar a partir de semillas (Ikuta, 1993; Marques, 1995; Marques & Barros, 2000) o por esquejes (Pardo, 1995). También hay datos escritos sobre la producción en invernaderos (Marques & Barros, 2001) y la evaluación del potencial de las semillas para la explotación en cultivo agrícola (Ikuta, 1993; Marques, 1995; Marques & Barros, 2000).

15 La marcela es una hierba anual, monoica, ramificada que crece hasta 1,5 m de altura, cubierta de pelos blancos. Tiene hojas alternas, enteras, sésiles, lineales y lanceoladas, de hasta 12 cm de largo y 1,8 cm de ancho. Tiene un capítulo con dos tipos de flores, que se reúnen en una panícula corimbosa; flores doradas-amarillas, con uno o dos centros hermafroditas de una corola tubulosa, así como cuatro o cinco flores marginales, las cuales son femeninas con una corola filiforme. Su fruto es aquenio, glabro y marrón (Simões et al., 1998; Medeiros et al., 2005).

20 Investigaciones farmacológicas de extractos y sus inflorescencias demuestran actividades sedantes, analgésicas, antiinflamatorias y antiespasmódicas (Simões, 1988; Oliveira et al., 2001), actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (Lemos, 2000), actividad vasorrelajante (Hnatyszyn et al., 2004), actividad antihiper glucémica (Carney et al., 2002) y actividad hepatoprotectora (Kadarian et al., 2002).

25 También se ha informado que comúnmente se usa para tratar diferentes dolores, problemas digestivos (D'Ávila, 1910; Ritter et al., 2002) y, más recientemente, para la pérdida de peso (Dickel et al., 2007).

Los procedimientos extractivos para obtener el extracto de *Achyrocline satureioides* (marcela) y, más específicamente, su uso en composiciones destinadas para la prevención y el tratamiento de reacciones inflamatorias, ya son conocidos.

30 En este contexto, se puede resaltar el documento de patente Brasileño PI0103468-5, el cual describe un procedimiento de extracción de los compuestos activos de *Achyrocline satureioides*.

El uso del producto resultante a partir de ese procedimiento tiene el potencial para ser usado en la preparación de medicinas para el tratamiento de molestias gastrointestinales, que surgen de la indigestión (antiespasmódico) y para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias y las infecciones víricas tóxicas relacionadas con los herpes.

35 Básicamente, el procedimiento de extracción que es el objeto de ese documento de patente brasileño incluye las siguientes fases: preparar el material que consiste en inflorescencias secas y molidas de *Achyrocline satureioides*; poner este material en contacto con un macerador que contiene un disolvente orgánico polar tal como el alcohol C₁ a C₄ o mezclar con agua; separar los sólidos presentes en la mezcla de extracción de la fase líquida; tratar la disolución con agentes adyuvantes tales como dióxido de silicio coloidal, por ejemplo; y secar el extracto resultante.

40 Después de evaluar un documento escrito por los mismos inventores (Bassani et al. 1997), y anterior a ese documento de patente, se aprendió que el procedimiento consiste en un maceración que usa una disolución disolvente en la proporción de 7,5% (p/v), o más, 7,5 g de la planta por cada 100 ml de disolución disolvente. Además, para cada fase del procedimiento de extracción, objeto de ese estado del documento de la técnica, la mezcla puede ser, preferentemente, etanol/agua en la proporción de etanol al 80% y agua al 20% o en concentraciones crecientes de etanol hasta etanol al 100%. En este contexto, se debería observar que el anteriormente mencionado estado del documento de la técnica brasileño describe un procedimiento que requiere un largo tiempo, debido al uso de maceración, cuya extracción ocurre a una temperatura ambiente y puede llevar de 24 a 160 horas, de acuerdo con el documento. Además, el procedimiento es de baja eficacia para la extracción de los compuestos de interés, principalmente, quercetina y 3-O-metilquercetina, debido a que el extracto seco contiene aquellos compuestos en concentraciones de, como mucho, 0,9391% y 0,7294%, respectivamente. También se sabe que en este documento de patente de la técnica anterior, la 3-O-metilquercetina está dosificada concomitantemente con luteolina, dando como resultado el contenido de la 3-O-metilquercetina que es incluso menos del 0,7294%.

En relación con el uso de los extractos de *Achyrocline satureioides* en productos cosméticos y farmacéuticos se destaca, por ejemplo, el documento Japonés JP10226619, el cual describe una preparación para la piel para uso

- 5 externo que presenta una acción antioxidante para prevenir la oxidación de los componentes lipídicos usando el extracto de una planta del género *Achyrocline*, tal como marcela (*Achyrocline satureioides*). Ese documento Japonés describe un procedimiento que implica las flores, los tallos, las raíces, las hojas y las semillas de las especies pertenecientes al género *Achyrocline*. Sin embargo, un experto en la técnica sabe que las sustancias de interés para los beneficios de nuestra patente, principalmente la quercetina y la 3-O-metilquercetina, están concentradas en las inflorescencias y no se encuentran en cantidades adecuadas en los otros órganos, tales como las hojas, los tallos y las raíces para la producción de un concentrado de extracto seco en estas sustancias.
- 10 El documento JP 59044313 describe una composición antibacteriana que es útil como cosmético eficaz en el tratamiento del acné, etc., que usa quercetina como componente activo y rutina e isoramnetina o 3-O-rutinósido como componentes esenciales y auxiliares. La actividad antibacteriana de la composición es elevada en un pH débilmente ácido de aproximadamente 5,0-5,5 y la composición es adecuada para usarse en el tratamiento del acné frente a *Propionibacterium acnes*. La concentración de la quercetina es preferentemente de 0,2 a 0,6% en peso.
- 15 El documento Norteamericano US 2004/0170581 también describe preparaciones cosméticas que contienen una cantidad eficaz de al menos un éster derivado de ácido cafeico. Una de las actividades atribuidas a estos ésteres se basa en su potencial antiinflamatorio.
- Este documento Norteamericano también describe las fuentes para obtener el ácido cafeico anteriormente mencionado. El mecanismo antiinflamatorio de los ésteres del ácido cafeico descrito por este documento se basa en su acción inhibitoria sobre la liberación de los mediadores proinflamatorios, por los mastocitos, eosinófilos y basófilos.
- 20 El documento Norteamericano US 7.192.611 describe un método de tratamiento de la osteoartritis que comprende la administración de una composición basada en flavonoides con un anillo B no sustituido y, opcionalmente, un vehiculizante fisiológicamente aceptable. Las especies del género *Achyrocline* están mencionadas entre las fuentes reclamadas como opciones para la extracción de los susodichos flavonoides.
- 25 El documento Norteamericano US 2008/0070875 describe una composición para el tratamiento del acné que incluye un antimicrobiano/molécula de polifenol(es) antiinflamatorio(s), incluyendo quercetina y ácido rosmarínico en combinación con ácido salicílico y/o sales de salicilato en un vehiculizante cosmético. También se refiere a un método para el tratamiento del acné mediante administración de manera tópica de una composición en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la rojez y los granitos asociados con el acné. Ese documento no menciona marcela como fuente de ingredientes activos a usar en el tratamiento del acné.
- 30 Por consiguiente, ese documento Norteamericano está directamente relacionado con el potencial antiinflamatorio (inhibición de COX-2) de los extractos derivados de las especies pertenecientes al género *Achyrocline*.
- El documento Norteamericano US 2004/0220119 describe un método del tratamiento de enfermedades mediadas por la acción de COX y LOX. Este método se basa en la aplicación local de una composición que contiene flavonoides con un anillo B no sustituido y, al menos, un flavano. Una de las opciones reivindicadas como fuente para obtener los flavonoides con un anillo B no sustituido son las especies vegetales pertenecientes al género *Achyrocline*.
- 35 Tal como un experto en la técnica sabe, las cadenas enzimáticas COX y LOX están directamente relacionadas con los mecanismos de inflamación. Por lo tanto, este documento hace referencia al potencial antiinflamatorio de los extractos de las especies pertenecientes al género *Achyrocline*.
- 40 Además, esos documentos Norteamericanos no están directamente relacionados con el ámbito cosmético y, por lo tanto, las bases de las composiciones de aplicación tópica capaces de estabilizar los flavonoides con un anillo B no sustituido no están descritos en detalle.
- 45 A partir de la siguiente descripción de la presente invención, se puede concluir que ninguno documento del estado de la técnica presenta, como objetivo, un procedimiento de extracciones alcohólicas y/o hidroalcohólicas múltiples de las inflorescencias de *Achyrocline satureioides* (marcela), dando como resultado un extracto que contiene, al mismo tiempo, quercetina y 3-O-metilquercetina en una concentración elevada. Además, el extracto de marcela resultante a partir del procedimiento de la presente invención presenta actividades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas.
- 50 También, se describirán composiciones cosméticas, farmacéuticas y veterinarias que contienen el susodicho extracto de marcela, usado para la prevención cosmética y farmacéutica y el tratamiento de las patologías que surgen de los procedimientos inflamatorios, infecciones microbianas y lesiones celulares mediante procedimientos oxidativos.

Objetivos de la invención

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un procedimiento de extracción de inflorescencias de *Achyrocline satureioides* (marcela) que dé como resultado un extracto que contenga concentraciones elevadas de quercetina y 3-O-metilquercetina presentando un alto rendimiento y un bajo uso de etanol.

5 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un extracto estandarizado de quercetina y 3-O-metilquercetina a partir de inflorescencias de *Achyrocline* que comprende las siguientes etapas:

- A) moler las inflorescencias de *Achyrocline satureioides* para obtener un material de planta molida;
- 10 B) someter la planta molida a al menos cuatro fases secuenciales de extracción hidroalcohólica a una temperatura de 60°C a 80°C, durante 3 a 4 horas para cada fase, para obtener 4 extractos hidroalcohólicos intermedios;
- C) combinar los 4 extractos hidroalcohólicos intermedios;
- D) concentrar la mezcla de los extractos hidroalcohólicos intermedios; para obtener hasta un máximo del 20% de la masa inicial de los extractos hidroalcohólicos intermedios;
- 15 E) secar el material obtenido en (D).

También se ha descrito en la presente memoria una composición cosmética y una composición farmacéutica que comprenden, en un vehiculizante fisiológicamente aceptable, un extracto de inflorescencia de marcela obtenido a partir del procedimiento de extracción de inflorescencias de *Achyrocline satureioides* anteriormente descrito.

Breve descripción de las figuras

- 20 La Figura 1 ilustra un esquema de una realización preferida del procedimiento de extracción, objeto de la presente invención;
- la Figura 2 ilustra el resultado de la prueba del perfil fitoquímico de los extractos obtenidos a partir del procedimiento, objeto de la presente invención;
- 25 la Figura 3 ilustra el resultado de la prueba de la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución realizada con tres ejemplos de extractos obtenidos mediante el procedimiento, objeto de la presente invención;
- la Figura 4 ilustra el resultado del ensayo de fototoxicidad, refiriéndose al extracto de marcela obtenido mediante el procedimiento, objeto de la presente invención;
- la Figura 5 ilustra el resultado del ensayo de citotoxicidad, refiriéndose al extracto de marcela obtenido mediante el procedimiento, objeto de la presente invención;
- 30 la Figura 6 ilustra, a la izquierda, la separación de los compuestos del extracto de inflorescencia de marcela con un sistema disolvente de cloroformo/acetato de etilo/metanol/agua (60:32:12:8) y revelado con NP/PEG. A la derecha se muestran los halos de inhibición formados después de la incubación durante 72 horas con *P. acnes* ATCC 6538 y revelado con cloruro de tetrazolio (TTC, del Inglés "Tetrazolium Chloride");
- 35 la Figura 7 ilustra el resultado del ensayo de la actividad del extracto de inflorescencia de marcela en un modelo de fibroblasto con inducción por LPS;
- la Figura 8 ilustra el resultado del ensayo de la actividad del extracto de inflorescencia de marcela en un modelo de fibroblasto con inducción por UVB;
- 40 la Figura 9 ilustra el resultado de la prueba de la actividad antiinflamatoria del extracto de inflorescencia de marcela en un modelo de cepa de queratinocitos humanos (HaCaT) mediante la inducción de la producción de citoquina por *Propionibacterium acnes* inactivada por temperatura (80°C, 30 min);
- la Figura 10 ilustra el resultado del ensayo de la actividad antioxidante del extracto de marcela obtenido a partir del procedimiento, objeto de la presente invención.
- 45 la Figura 11 ilustra el resultado del ensayo de la Concentración Inhibidora Mínima (MIC, del Inglés "Minimum Inhibitory Concentration") para dos lotes y el portador.
- la Figura 12 ilustra el resultado del ensayo de la Concentración Inhibidora Mínima (MIC) para un tercer lote, quercetina y el portador.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un extracto estandarizado de quercetina y 3-O-metilquercetina a partir de inflorescencias de *Achyrocline satureioides* que comprende las siguientes etapas:

- moler las inflorescencias de *Achyrocline satureioides* para obtener un material de planta molida;
- 5 - someter la planta molida a al menos cuatro fases secuenciales de extracción con etanol o hidroalcohólica (siendo al menos el 50% del disolvente alcohol) bajo calentamiento de 60°C a 80°C, durante 3 a 4 horas para cada fase, para obtener 4 extractos hidroalcohólicos intermedios;
- combinar los 4 extractos hidroalcohólicos intermedios;
- concentrar la mezcla de los extractos hidroalcohólicos intermedios hasta un máximo del 20% de la masa inicial de los extractos hidroalcohólicos intermedios;
- 10 - secar el material resultante.

Preferiblemente las etapas secuenciales de las extracciones hidroalcohólicas se llevan a cabo bajo reflujo, durante 12 horas y comprenden las siguientes fases:

- i) someter a extracción un extracto intermedio con una disolución hidroalcohólica 1:30 (m/m de material de planta molida/disolución de extracción) durante un periodo de 3 a 4 horas, preferiblemente durante al menos 3 horas, a una temperatura en el intervalo de 60 a 80°C, preferiblemente a 80°C, para obtener una primera disolución extraída;
- 15 ii) volver a someter a extracción el extracto hidroalcohólico de (i) con una disolución hidroalcohólica en la proporción de 1:20 (m/m de fármaco de planta/disolución de extracción) durante un periodo de 3 horas a una temperatura de 80°C obteniendo así una segunda disolución extraída;
- 20 iii) combinar la primera y la segunda disolución extraída para obtener una tercera disolución extraída;
- iv) someter a extracción un lote fresco de planta molida con dicha tercera disolución extraída en la proporción de 1:30 (m/m de ingrediente de planta molida/disolución extraída de las fases 1 y 2) durante un periodo de 3 horas a una temperatura de 80°C;
- 25 v) volver a someter a extracción el extracto hidroalcohólico de la fase (iv) con una disolución hidroalcohólica en la proporción de 1:16 (m/m de extracto hidroalcohólico/disolución de extracción) durante 3 horas a 80°C para obtener una disolución extraída final.

El procedimiento de extracción, objeto de la presente invención, es altamente eficaz (hasta 64,62% de rendimiento en relación con la quercetina de acuerdo con la realización preferente) con un reducido consumo de disolvente. Por ejemplo, se usaron 546,875 litros de etanol para 28,13 kg de inflorescencias de marcela, es decir, 19,44 litros de etanol por cada kg de inflorescencia de marcela.

Es un procedimiento limpio (sin subproductos indeseables o el uso de disolventes dañinos al medio ambiente), presentando un resultado optimizado en relación con las enseñanzas de la técnica anterior. Se proporciona un extracto con 3 veces más de quercetina que el descrito en el documento PI0103468-5, usando menos etanol y comprendiendo también 3-O-metilquercetina.

Presenta una constitución ideal para usarse como antiinflamatorio, antioxidante y antimicrobiano, tal como se describirá más adelante.

Las proporciones preferibles de etanol y agua usadas en las fases de extracción son 1:1 m/m etanol:agua o 1,25:1 v/v etanol:agua, y la cantidad de agua se puede reducir hasta que únicamente se usa etanol.

40 De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, los compuestos químicos quercetina (CAS 117-39-5) y 3-O-metilquercetina (CAS 1486-70-0) se mantienen y están concentrados en el extracto resultante final.

En la bibliografía técnica no se encuentran datos que describan la presencia de estos dos componentes, concomitantemente, y en similares proporciones a las descritas por este procedimiento, derivados de las inflorescencias de marcela. Sobre la evaluación del procedimiento objeto de la presente invención, se puede percibir que una de las ventajas del susodicho procedimiento es su bajo coste debido a que los disolventes están fácilmente disponibles y se conocen bien. El equipo es convencional y tiene un impacto medioambiental reducido debido a la menor cantidad de residuos orgánicos eliminados después del procedimiento. Esto es porque el alcohol evaporado se puede volver a usar para una nueva extracción de inflorescencias de marcela.

50 En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento para obtener el extracto de marcela comprende las siguientes etapas:

- 5 i) moler las inflorescencias de marcela, para obtener el fármaco de planta molida en un molinillo de cuchillas (“knife grinder”);
- 5 ii) mezclar el fármaco de planta molida con una disolución hidroalcohólica de extracción en la proporción de 1:1 (m/m), usando etanol 96°GL como alcohol, en la proporción inicial de 1 parte de ingrediente vegetal por 30 partes de disolución hidroalcohólica, en base a la masa de los materiales. Realizar la extracción de los compuestos durante un periodo de al menos 3 horas a una temperatura de 80°C en un reactor cerrado;
- 10 iii) filtrar la mezcla obtenida en ii) para obtener un primer extracto hidroalcohólico intermedio y un primer residuo que consiste en los componentes del fármaco de la planta no extraído;
- 10 iv) mezclar el primer residuo que consiste en los componentes del fármaco de planta no extraído con una disolución hidroalcohólica de extracción fresca, constituida por una mezcla de etanol 96°GL y agua en la proporción 1:1 (m/m). La masa de la disolución hidroalcohólica de extracción a añadir es 2/3 de la masa de la primera disolución hidroalcohólica de extracción durante un periodo de 3 horas a una temperatura de 80°C en un reactor cerrado;
- 15 v) filtrar la mezcla obtenida en iv) para obtener un segundo extracto hidroalcohólico intermedio y un segundo residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído;
- 15 vi) moler una segunda cantidad del fármaco de planta, obteniendo una segunda cantidad de fármaco de planta molida;
- 20 vii) mezclar el primero y el segundo extracto hidroalcohólico intermedio con la segunda cantidad de fármaco de planta molida obtenido en vi) en la proporción de 1:30 (m/m de fármaco de planta/disolución hidroalcohólica de extracción) durante un periodo de 3 horas a una temperatura de 80°C (intervalo: 60°C a 80°C) en un reactor cerrado;
- 20 viii) filtrar la mezcla obtenida en vii) para obtener un tercer extracto hidroalcohólico intermedio y un tercer residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído;
- 25 ix) mezclar el tercer residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído con una nueva disolución hidroalcohólica, constituida por una mezcla de etanol 96°GL y agua en la proporción 1:1 (m/m). La masa de la nueva disolución hidroalcohólica de extracción a añadir es 11/20 de la masa del tercer extracto hidroalcohólico intermedio durante un periodo de 3 horas a una temperatura de 80°C en un reactor cerrado.
- 30 x) filtrar la mezcla obtenida en ix) para obtener un cuarto extracto hidroalcohólico intermedio y un cuarto residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído;
- 30 xi) evaporar el etanol de la mezcla obtenida en x) mediante evaporación asistida por vacío (temperatura de 60°C, vacío de 93,32 kPa (700 mmHg)) hasta que la masa corresponda a aproximadamente 25% de la masa de la mezcla obtenida en x);
- 35 xii) mezclar el concentrado de xi) con un vehiculizante apropiado para llevar a cabo el secado mediante secador por pulverización, preferiblemente maltodextrina en la proporción máxima en masa de 50% de los sólidos esperados en el producto cuando se seca.
- 35 xiii) rociar la suspensión obtenida en xii) en un secador por pulverización con una temperatura de entrada de 185°C y una temperatura de salida de 85°C.

40 En una de las realizaciones preferentes de la presente invención, la fase final de la concentración se realiza en un concentrador al vacío a una temperatura de 60°C y un vacío de 79,99 kPa (600 mmHg), en donde el susodicho extracto hidroalcohólico final está concentrado aproximadamente 4 veces. Después de la etapa de concentración, se añade un polisacárido a la disolución respetando una proporción de 50% en masa con respecto al estimado de masa seca presente en la disolución, siendo éste preferentemente maltodextrina no genéticamente modificada. Otros materiales que también se pueden añadir a esta fase son dióxido de silicio, amida y ciclodextrina. Esta mezcla se somete a secado mediante secador por pulverización (temperatura de entrada de 180/185°C y temperatura de salida de 80/85°C bajo agitación) para obtener un extracto seco.

Como ejemplo, el equipo que se puede usar en el procedimiento, objeto de la presente invención, es:

- Molinillo: molino de martillos (“hammer mil”) con tamices abiertos de 5 y 10 mm;
- Reactor: capacidad de 750 litros;
- 50 - Concentrador: concentrador mediante evaporación convencional, capacidad productiva de 50 a 200 kg/h, potencial instalado de 7,5 kW;

- Secador por pulverización: secador atomizador, flujo concurrente con un disco rotativo, capacidad de evaporación de agua de 15 a 25 l/hora.

El contenido de etanol evaporado en la fase de concentración final se determinará mediante alcómetros y se volverá a usar en un nuevo procedimiento extractivo de marcela.

- 5 Es necesario funcionar con al menos 4 fases de extracciones distintas y secuenciales para obtener un extracto de marcela con los compuestos concentrados de interés. Si se empleara una fase simple de extracción, no se alcanzaría la concentración requerida. Además, proporcionalmente, el volumen del disolvente usado puede ser mucho menor que el usado en una única fase debido a que el disolvente se puede volver a usar en fases sucesivas.

- 10 El uso de otros disolventes o la realización de otros procedimientos para obtener el extracto de marcela puede dar como resultado la pérdida de al menos uno de los componentes químicos de interés: quercetina y/o 3-O-metilquercetina.

- 15 Durante el procedimiento de la presente invención, los disolventes usados para la extracción son básicamente etanol y agua, en la proporción de 15,55 kg de agua y 15,55 kg de etanol por cada 1 kg de fármaco de planta a someter al procedimiento de extracción. Para cada fase de extracción del procedimiento de acuerdo con la presente invención, la mezcla puede ser, preferentemente, etanol/agua (1:1 m/m) hasta completamente etanol.

- 20 Con la realización de todas las fases anteriormente mencionadas, se obtiene un extracto de marcela que está estandarizado en quercetina y 3-O-metilquercetina, obtenido mediante un procedimiento extractivo con un rendimiento de hasta el 67,4% en relación con la masa de quercetina. Las concentraciones de quercetina y 3-O-metilquercetina son hasta 301% y 262%, respectivamente, en relación con la masa de quercetina (CAS 117-39-5) y 3-O-metilquercetina (CAS 1486-70-0) presente en las inflorescencias. El contenido actual obtenido mediante el procedimiento era de hasta el 3,01% para la quercetina y hasta el 2,62% para la 3-O-metilquercetina. El extracto seco se obtuvo a partir de un fármaco de planta con un contenido del 1,00% de quercetina en una base seca.

La Figura 1 ilustra un esquema de un ejemplo de una realización preferente del procedimiento de extracción, objeto de la presente invención.

- 25 El extracto seco de inflorescencias de *Achyrocline satureioides* (marcela) resultante a partir del procedimiento de acuerdo con la presente invención, está constituido, básicamente, por altas concentraciones de los flavonoides: quercetina y 3-O-metilquercetina. Este extracto seco estandarizado presenta actividades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas.

Los factores que se deberían controlar en este procedimiento, en particular, son:

- 30 - la proporción de la composición de la mezcla hidroalcohólica extractiva debería ser una parte de etanol por una parte de agua, expresadas en masa;
- la temperatura usada en las etapas de extracción deberían estar entre 60°C y 80°C;
 - el tiempo de la extracción debería estar entre 3 horas y 4 horas;
- 35 - la temperatura de secado cuando se realiza en un secador por pulverización debería estar entre 180°C y 185°C para la entrada del material y entre 80°C y 85°C para la temperatura de salida del material;
- se debería respetar la secuencia de las fases de extracción y la cantidad suministrada al equipo en estas fases.

Las ventajas percibidas de emplear el procedimiento de acuerdo con la presente invención, se resaltan como sigue:

- 40 - el procedimiento para obtener un extracto de marcela es altamente eficiente: 60% de eficiencia de rendimiento en relación con la masa de quercetina (CAS 117-39-5);
- los disolventes usados en las etapas de extracción son de bajo coste y reutilizables. Además, el etanol es una fuente naturalmente renovable. Es un procedimiento limpio con un resultado optimizado;
 - el extracto contiene quercetina (CAS 117-39-5) y 3-O-metilquercetina (CAS 1486-70-0) en altas concentraciones. Estos dos compuestos químicos se encuentran en estas concentraciones en extractos obtenidos mediante solamente una extracción de una fase. También, el procedimiento de una fase tiene una concentración de quercetina 3 veces menor que la obtenida en el procedimiento de la presente invención;
- 45 - el extracto obtenido tiene diversas actividades y, por lo tanto, se puede usar para productos antiinflamatorios, antiacné, antimicrobianos y antioxidantes, para el tratamiento de la disfunción eréctil y para el tratamiento farmacológico de asma bronquial;
- 50

- el extracto puede sustituir parcial o totalmente un complejo antioxidante porque funciona como antioxidante en la fórmula;
 - el uso del extracto incrementa el índice de contenido vegetal de fórmulas cosméticas;
 - el extracto obtenido se considera que es un producto de origen vegetal y natural;
- 5
- la obtención del susodicho extracto tiene una buena relación coste beneficio para las clases de productos farmacéuticos, cosméticos y veterinarios para los que se destinan;
 - el extracto no afecta al color, olor y aspecto del producto.

Ejemplo del procedimiento de preparación del extracto de marcela

10 El siguiente ejemplo es una realización preferente del procedimiento de preparación del extracto de marcela de la presente invención y no se debería interpretar como una limitación a la susodicha invención. En este contexto, se debería entender que el alcance de la presente invención tiene otras realizaciones posibles y está limitado solamente por el contenido de las reivindicaciones adjuntas, incluyendo todos los posibles equivalentes en las mismas.

- i) moler las inflorescencias de marcela, para obtener el fármaco de planta molida en un molinillo de cuchillas;
- 15 ii) mezclar el ingrediente de planta molida con una disolución hidroalcohólica de extracción en la proporción de 1:1 (m/m), usando etanol 96°GL como alcohol, en la proporción inicial de 1 parte de fármaco de planta por 30 partes de disolución hidroalcohólica, en masa de los materiales. Realizar la extracción de los compuestos durante un periodo de 4 horas a una temperatura de 80°C en un reactor cerrado;
- 20 iii) filtrar la mezcla obtenida en ii) en un filtro con una especificación de porosidad de 60 mesh, para obtener un primer extracto hidroalcohólico intermedio y un primer residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído;
- iv) mezclar el primer residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído con una disolución hidroalcohólica de extracción fresca, constituida por una mezcla de etanol 96°GL y agua en la proporción 1:1 (m/m). La masa de disolución hidroalcohólica de extracción a añadir debería ser un máximo de 2/3 de la masa de la primera disolución hidroalcohólica de extracción durante un periodo de 4 horas a una temperatura de 80°C en un reactor cerrado;
- 25 v) filtrar la mezcla obtenida en iv) en un filtro con una especificación de porosidad de 60 mesh, para obtener un segundo extracto hidroalcohólico intermedio y un segundo residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído;
- 30 vi) moler una segunda cantidad de fármaco de planta en un molinillo de cuchillas, obteniendo una segunda cantidad de fármaco de planta molida;
- vii) mezclar el primero y el segundo extracto hidroalcohólico intermedio con la segunda cantidad de fármaco de planta molida obtenida en vi) en la proporción de 1:30 (m/m de fármaco de planta/disolución hidroalcohólica de extracción) durante un periodo de 4 horas a una temperatura de 80°C en un reactor cerrado;
- 35 viii) filtrar la mezcla obtenida en vii) en un filtro con una especificación de porosidad de 60 mesh, para obtener un tercer extracto hidroalcohólico intermedio y un tercer residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído;
- ix) mezclar el tercer residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído con una disolución hidroalcohólica fresca, constituida por una mezcla de etanol 96°GL y agua en la proporción 1:1 (m/m). La masa a añadir de la disolución hidroalcohólica de extracción fresca es 11/20 de la masa del tercer extracto hidroalcohólico intermedio durante un periodo de 4 horas a una temperatura de 80°C en un reactor cerrado;
- 40 x) filtrar la mezcla obtenida en ix) en un filtro con una especificación de porosidad de 60 mesh, para obtener un cuarto extracto hidroalcohólico intermedio y un cuarto residuo constituido por los componentes del fármaco de planta no extraído;
- 45 xi) evaporar el etanol de la mezcla obtenida en xi) mediante evaporación asistida por vacío (temperatura desde 40°C a 60°C, vacío de 79,99 a 93,32 kPa (600 a 700 mmHg)) hasta que la masa corresponda a aproximadamente 25% de la masa de la mezcla obtenida en x);
- 50 xii) mezclar el concentrado obtenido en xi) con un vehiculizante (portador) apropiado para llevar a cabo el secado mediante secador por pulverización, siendo éste maltodextrina (u opcionalmente dióxido de silicio,

amida o ciclodextrina) en la proporción máxima en masa de 50% de los sólidos esperados en el producto cuando se seca.

- xiii) atomizar la suspensión obtenida en xii) en un secador por pulverización con una temperatura de entrada de 180 a 185°C y una temperatura de salida de 80 a 85°C.

5 Pruebas y ensayos

I. Prueba mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El resultado de la prueba del perfil fitoquímico comparativo mediante HPLC entre los tres lotes obtenidos a partir del procedimiento de extracción descrito en el anterior ejemplo está ilustrado en la Figura 2.

- 10 La Tabla 1 muestra a continuación el contenido de quercetina y 3-O-metilquercetina presente en los susodichos lotes de extracto de inflorescencias de marcela.

Tabla 1

Muestra	Compuesto	Contenido Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
Lote 1	quercetina	2,95%	0,01%	0,21%
	3-O-metilquercetina	2,62%	0,01%	0,47%
Lote 2	quercetina	2,60%	0,01%	0,21%
	3-O-metilquercetina	2,30%	0,01%	0,42%
Lote 3	quercetina	3,01%	0,02%	0,72%
	3-O-metilquercetina	2,60%	0,01%	0,44%

- 15 Se determinó el contenido promedio mediante el método analítico cuantitativo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, del Inglés "High Performance Liquid Chromatography") para muestras en triplicado mediante dos inyecciones consecutivas de cada alícuota. El análisis del contenido de quercetina (CAS 117-39-5) y 3-O-metilquercetina (CAS 1486-70-0) se usó para verificar la reproducibilidad del procedimiento de producción de los tres lotes. En resumen, se tomaron alícuotas de los 3 lotes que alcanzaban un promedio entre 2,6% y 3,0% de quercetina y 2,3% y 2,6% de 3-O-metilquercetina. Las muestras se diluyeron en metanol y se sometieron a análisis mediante HPLC. Las condiciones del sistema cromatográfico:

- 20 Columna: Merck Lichrospher 100RP18e (4,6x250 mm, 5 µm)

Sistema: Isocrático

Fase móvil: ácido fosfórico al 0,5%:metanol (1:1/ v:v)

Temperatura: 25°C

Flujo: 0,6 ml/min

- 25 Longitud de onda: 370 nm

Volumen de inyección: 20 µl

Tiempo de ejecución: 55 minutos

Patrón: quercetina dihidratada (CAS 117-39-5)

- 30 Nota: la concentración de 3-O-metilquercetina (CAS 1486-70-0) se dosificó como la quercetina (CAS 117-39-5) porque tiene el mismo grupo cromatográfico.

II. Prueba mediante Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC)

- 35 La Figura 3 ilustra la evaluación fitoquímica mediante HPTLC (siglas del Inglés, "High Performance Thin Layer Chromatography") que se realizó para identificar los otros compuestos que no se observaron en la HPLC. La prueba demostró que la extracción de otros compuestos también era reproducible en los tres lotes. Se identificaron otros compuestos químicos, principalmente, apigenina y ácido clorogénico. La investigación usando técnicas de

5 cromatografía en capa fina permitió la comparación de los tiempos de retención de los patrones de referencia y la coloración obtenida después de la derivatización con reactivos específicos. Para la evaluación de las sustancias identificadas, las placas cromatográficas se sometieron a derivatización con el reactivo NP/PEG y se evaluaron bajo luz UV a 365 nm. El reactivo de NP/PEG consiste en una mezcla 1:1 de una disolución de polietilenglicol 4.000 al 5% en etanol y una disolución de difenil borato de aminoetanol al 1% en metanol.

III. Ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad

Se evaluaron la fototoxicidad y la citotoxicidad para uno de los lotes del extracto de marcela producido de acuerdo con el procedimiento del anterior ejemplo.

10 El estudio de la fototoxicidad se condujo con el objetivo de evaluar el potencial fototóxico en fibroblastos de cepa permanente 3T3 en presencia y ausencia de luz UVA.

El estudio de la citotoxicidad se condujo con el objetivo de evaluar el potencial citotóxico de una sustancia por medio de metodología *in vitro*, la cual evalúa el potencial de citotoxicidad de la sustancia de ensayo en fibroblastos de la cepa permanente 3T3 en concentraciones diferentes.

La Figura 4 ilustra el resultado del ensayo de fototoxicidad relacionado con el extracto de marcela.

15 La Figura 5 ilustra el resultado del ensayo de citotoxicidad relacionado con el extracto de marcela.

Como resultado, se concluyó que el extracto de marcela obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención no presentó potencial fototóxico en ninguno de sus concentraciones ensayadas y que el potencial citotóxico es bajo, presentando $IC_{50}=0.5$ mg/ml. Por consiguiente, el susodicho extracto seco de marcela puede ser indicado para el uso tópico para seres humanos.

20 IV. Halo de inhibición en un cultivo de *Propionibacterium acnes*

Esta prueba se realizó para determinar el potencial bacteriostático del extracto de inflorescencias de marcela resultante a partir del procedimiento de acuerdo con la presente invención, es decir, la capacidad que el extracto tiene de inhibir el desarrollo de la colonia de *Propionibacterium acnes*.

25 Para estos ensayos, se aplicaron 0,5% del extracto seco de inflorescencias de marcela en una formulación cosmética básica (base A).

Las mediciones del halo de inhibición del extracto seco de marcela aplicado a una formulación cosmética básica se compararon con el producto farmacéutico disponible en el mercado, BENZAC AC® producido por Galderma, el cual tiene peróxido de benzoilo al 5,0% como ingrediente activo.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en el ensayo:

Formulaciones ensayadas	Halo medido
Base A – no extracto	Ausente
Base A – 0,10% de extracto	Ausente
Base A – 0,25% de extracto	Ausente
Base A – 0,50% de extracto	10,0 mm
Base A – 1,50% de extracto	15,0 mm
BENZAC AC® al 5,0%	10,0 mm

30 En base a los resultados anteriormente enumerados se puede observar que la composición cosmética básica con 0,5% de extracto de marcela demostraba los mismos resultados que el producto citado BENZAC AC®, a pesar de que presenta un ingrediente antimicrobiano activo en una concentración 10 veces menor en la fórmula. También se demostró que la base cosmética para la aplicación del extracto no presenta ninguna capacidad de inhibición de *Propionibacterium acnes*.

V. Concentración inhibidora Mínima (MIC)

Los ensayos se llevaron a cabo para evaluar las concentraciones inhibidoras mínimas de 3 lotes del extracto seco de inflorescencias de marcela producido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención frente a *Propionibacterium acnes*.

ES 2 553 869 T3

El procedimiento usado para este ensayo es el siguiente:

Preparación del inóculo: el microorganismo a usar en el ensayo se replicó a un matraz de cristal que contenía 10 ml caldo de medio de cultivo esterilizado (TSB);

- se incubaron los matraces a 35°C +/- 2°C durante 24 horas;
- 5 - se repitió el anterior procedimiento durante 2 días consecutivos;
- se distribuyeron 100 microlitros de caldo TSB en una microplaca con la excepción de la columna 1;
- la columna 1 se inoculó con 200 microlitros de la muestra a ensayar previamente preparada y solubilizada;
- se llevaron a cabo las diluciones al transferir 100 microlitros de la columna 1 a la columna 2 y 100 microlitros de la columna 2 a la columna 3 y así sucesivamente hasta la columna 10. Las columnas 11 y 12 se reservaron para los controles de inóculo y medio TSB respectivamente;
- 10 - después de que se llevaron a cabo las diluciones, se inocularon 20 microlitros de cada microorganismo a ensayar en todos los pocillos de la microplaca con la excepción de la columna 12 (control del medio de cultivo);
- se incubaron las microplacas inoculadas con bacterias a 35°C +/- 2°C durante 48 horas y las microplacas inoculadas con levaduras y mohos a 25°C +/- 2°C durante 72 horas. La placa en la que se inoculó *Propionibacterium acnes* fue incubada bajo anaerobiosis a 35°C +/- 2°C durante 96 horas;
- 15 - después del periodo de incubación se llevó a cabo la lectura, observando así la turbidez de los pocillos;
- se pesaron las muestras y se diluyeron en el vehiculizante etanol 96°GL/agua destilada (1:1) de acuerdo con los pesos y volúmenes de a continuación:

Muestra	quercetina	BDP 009960	BDP 009960	BDP 009960
Lote	MM2-7016	PI001	PI002	PI003
Contenido de quercetina	100,0	2,95	2,60	3,01
Masa de la muestra (mg)	29,1	1.005,9	1.122,2	990,9
Dilución inicial (ml)	100,0	100,0	100,0	100,0

20 La dilución fue ayudada por microondas durante 30 minutos. Después de la dilución se filtraron las muestras por gravedad sobre papel de filtro de calidad. Se calcularon las diluciones para que los lotes de la muestra BDP 09960 contuvieran la misma concentración de quercetina entre ellos y en relación con la concentración de quercetina pura diluida.

25 Las concentraciones preparadas fallaron para determinar la MIC, pero los resultados mostraron que para cada lote, denominados como PI001, PI002, PI003 MICs caen por debajo de 0,020, 0,022 y 0,019 mg/ml, respectivamente, tal como se ilustra en las Figuras 11 y 12 y se muestra en las tablas de a continuación:

Tabla 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10,059/ 0,2967*	5,030/ 0,1484*	2,515/ 0,0742*	1,257/ 0,0371*	0,629/ 0,0185*	0,314/ 0,0093*	0,157/ 0,0046*	0,079/ 0,0023*	0,039/ 0,0012*	0,020/ 0,0006*	Inóculo	TSB
B	10,059/ 0,2967*	5,030/ 0,1484*	2,515/ 0,0742*	1,257/ 0,0371*	0,629/ 0,0185*	0,314/ 0,0093*	0,157/ 0,0046*	0,079/ 0,0023*	0,039/ 0,0012*	0,020/ 0,0006*	Inóculo	TSB
C	10,059/ 0,2967*	5,030/ 0,1484*	2,515/ 0,0742*	1,257/ 0,0371*	0,629/ 0,0185*	0,314/ 0,0093*	0,157/ 0,0046*	0,079/ 0,0023*	0,039/ 0,0012*	0,020/ 0,0006*	Inóculo	TSB
D	11,222/ 0,2918*	5,611/ 0,1459*	2,806/ 0,0729*	1,403/ 0,0365*	0,701/ 0,0182*	0,351/ 0,0091*	0,175/ 0,0046*	0,088/ 0,0023*	0,044/ 0,0011*	0,022/ 0,0006	Inóculo	TSB
E	11,222/ 0,2918*	5,611/ 0,1459*	2,806/ 0,0729*	1,403/ 0,0365*	0,701/ 0,0182*	0,351/ 0,0091*	0,175/ 0,0046*	0,088/ 0,0023*	0,044/ 0,0011*	0,022/ 0,0006	Inóculo	TSB
F	11,222/ 0,2918*	5,611/ 0,1459*	2,806/ 0,0729*	1,403/ 0,0365*	0,701/ 0,0182*	0,351/ 0,0091*	0,175/ 0,0046*	0,088/ 0,0023*	0,044/ 0,0011*	0,022/ 0,0006	Inóculo	TSB
G	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	Inóculo	TSB
H	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	veículo	Inóculo	TSB

Notas:

Las concentraciones se muestran en mg/ml de muestra;

(*)= concentración calculada como el contenido de quercetina presente en la muestra

TSB= medio de cultivo

"Veículo" = "vehiculizante"

"Inóculo"= "inóculo"

Tabla 4:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	9,909 0,2983*	4,955 0,1491*	2,477 0,0746*	1,239 0,0373*	0,619 0,0186*	0,310 0,0093*	0,155 0,0047*	0,077 0,0023*	0,039 0,0012*	0,019 0,0006*	Inóculo	TSB
B	9,909 0,2983*	4,955 0,1491*	2,477 0,0746*	1,239 0,0373*	0,619 0,0186*	0,310 0,0093*	0,155 0,0047*	0,077 0,0023*	0,039 0,0012*	0,019 0,0006*	Inóculo	TSB
C	9,909 0,2983*	4,955 0,1491*	2,477 0,0746*	1,239 0,0373*	0,619 0,0186*	0,310 0,0093*	0,155 0,0047*	0,077 0,0023*	0,039 0,0012*	0,019 0,0006*	Inóculo	TSB
D	0,2910	0,1455	0,0728	0,0364	0,0182	0,0091	0,0045	0,0023	0,0011	0,0006	Inóculo	TSB
E	0,2910	0,1455	0,0728	0,0364	0,0182	0,0091	0,0045	0,0023	0,0011	0,0006	Inóculo	TSB
F	0,2910	0,1455	0,0728	0,0364	0,0182	0,0091	0,0045	0,0023	0,0011	0,0006	Inóculo	TSB
G	veículo	Inóculo	TSB									
H	veículo	Inóculo	TSB									

Notas:

Las concentraciones se muestran en mg/ml de muestra;

(*)= concentración calculada como el contenido de queratina presente en la muestra

TSB= medio de cultivo

“Veículo”= “vehiculizante”

“Inóculo”= “inóculo”

El valor de MIC encontrado para quercetina patrón con grado de pureza del 100% era de 0,0364 mg/ml. Puesto que la dilución máxima del extracto de marcela ensayada para los tres lotes es de aproximadamente 0,002 mg/ml y sabiendo que la MIC para ese extracto está en un intervalo de valores inferiores a éste, se concluye que el poder de ese extracto para la actividad de inhibición del crecimiento de *Propionibacterium acnes* es al menos de la misma magnitud que la propia quercetina en un estado de máxima pureza. Además, tomando en cuenta la concentración de los lotes de quercetina PI001, PI002 y PI003, principalmente 2,95, 2,60 y 3,01%, se indica que la concentración de quercetina presente en la dilución máxima del extracto de marcela de los tres lotes que aún tienen actividad en la inhibición del crecimiento de *Propionibacterium acnes* es de aproximadamente 0,0006 mg/ml, es decir, una concentración aproximadamente 60 veces inferior que la MIC de quercetina. Por tanto, aunque no se alcanzó la máxima dilución de dicho extracto de marcela para determinar la MIC, está claro que la actividad de inhibición del crecimiento de *Propionibacterium acnes in vitro* no se puede atribuir solamente a la presencia de quercetina en ese extracto obtenido de acuerdo con el procedimiento de la invención. Otros productos químicos, tales como 3-O-metilquercetina contribuyen al efecto completo del extracto por lo que respecta a esa actividad.

VI Bioautografía de *Propionibacterium acnes*

Las pruebas bioautográficas se condujeron para determinar las clases de los compuestos presentes en el extracto de inflorescencia de *Achyrocline satureioides* que realiza la actividad antibacteriana frente a *Propionibacterium acnes*. La bioautografía consiste en la separación cromatográfica de los compuestos mediante HPTLC y la posterior aplicación de la inoculación al medio de cultivo sobre la placa cromatográfica.

La Figura 6 ilustra, a la izquierda, la separación de los compuestos del extracto de inflorescencia de marcela con el sistema disolvente de cloroformo/acetato de etilo/metanol/agua (60:32:12:8) y revelado con NP/PEG. A la derecha, esa figura muestra los halos de inhibición formados después de la incubación durante 72 horas con *P. acnes* ATCC 6538 y revelado con cloruro de tetrazolio (TTC).

Los resultados obtenidos en la prueba de bioautografía demostraron que los flavonoides quercetina y 3-O-metilquercetina son los principales ingredientes responsables para la actividad antimicrobiana.

VII. Actividad antiinflamatoria en un modelo de fibroblastos en un modelo inflamatorio inducido por LPS (lipopolisacárido de una membrana de bacteria gram-negativa) y por radiación UVB

El potencial antiinflamatorio del extracto seco de inflorescencia de marcela se evaluó por medio de la dosificación de citoquinas proinflamatorias, usando un cultivo de fibroblastos de piel humana. El lipopolisacárido de una membrana de bacteria gram-negativa (LPS) o la radiación UVB se usaron para inducir el estímulo para la producción de citoquinas IL-6, IL-8 y de la prostaglandina PG-E2 en fibroblastos humanos en un cultivo con diferentes concentraciones de extracto.

La Figura 7 ilustra el resultado del ensayo de la actividad del extracto de inflorescencia de marcela en un modelo de fibroblastos con inducción por LPS.

La Figura 8 ilustra el resultado del ensayo de la actividad del extracto de inflorescencia de marcela en un modelo de fibroblastos con inducción por UVB.

Se concluye que, en el modelo de estimulación con LPS, el extracto presentó una reducción significativa en la secreción de PG-E2 en concentraciones entre 0,003 mg/ml y 0,03 mg/ml. En el modelo de estimulación con UVB, se notó una reducción significativa en la secreción de IL-6 y IL-8 en la concentración de 0,03 mg/ml, y la inhibición de PG-E2 en concentraciones entre 0,001 mg/ml y 0,03 mg/ml. De acuerdo con los datos analizados, el extracto de marcela indica actividad antiinflamatoria en fibroblastos de piel (dermis) humana *in vitro*.

VIII. Actividad antiinflamatoria en un modelo *in vitro* en un cultivo de queratinocitos humanos

El potencial antiinflamatorio del extracto seco de inflorescencias de marcela se evaluó por medio de la dosificación de citoquinas proinflamatorias, usando un cultivo de queratinocitos del linaje HaCat. Se usó *Propionibacterium acnes* inactivado para inducir la producción de IL-8 en queratinocitos del linaje HaCat en un cultivo con diferentes concentraciones del extracto, tal como comúnmente se alcanza con LPS (lipopolisacárido de una membrana de bacteria gram-negativa).

La Figura 9 ilustra el resultado de la prueba de la actividad antiinflamatoria del extracto de inflorescencia de marcela en un modelo de linaje de queratinocitos humanos (HaCat) con inducción por *Propionibacterium acnes*.

Se concluye que, en el modelo de estimulación con *P. acnes*, el extracto de inflorescencias de marcela obtenido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención presenta una reducción mayor del 30% en la secreción de IL-8 en las concentraciones entre 0,003 mg/ml y 0,03 mg/ml. De acuerdo con los datos analizados, el extracto de marcela indica actividad antiinflamatoria potencial en queratinocitos humanos del linaje HaCat *in vitro*.

IX. Ensayo de la actividad antioxidante

Los ensayos se realizaron para la actividad antioxidante mediante DPPH del extracto seco de marcela obtenido mediante secador por pulverización. Los ensayos indicaron que el IC₅₀ de la actividad antioxidante se obtenía con una concentración de extracto seco de marcela de 0,02 mg/ml. Trolox (un derivado de la vitamina E vendido por Hoffman LaRoche) se usó como patrón del susodicho ensayo y tiene su IC₅₀ de actividad antioxidante obtenido con 0,005 mg/ml. Por lo tanto, se puede concluir que el extracto seco de marcela tiene extremadamente alta eficacia antioxidante, únicamente 4 veces menos que Trolox.

La Figura 10 ilustra el resultado del ensayo para la actividad antioxidante del extracto de marcela obtenido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

10 **Composición cosmética y/o farmacéutica que comprende el extracto de marcela:**

La composición cosmética y/o farmacéutica, también descrita en la presente memoria, contiene un portador fisiológicamente aceptable y de 0,1% a 5,0%, en masa, preferiblemente, de 0,1% a 0,5% en masa, en base a la masa total de la composición, de extracto de inflorescencias de marcela obtenido a partir del procedimiento de extracción de inflorescencias de *Achyrocline satureioides* de acuerdo con la presente invención.

15 Una composición cosmética, farmacéutica o veterinaria, descrita en la presente memoria, que comprende un extracto de *Achyrocline satureioides* obtenido mediante el procedimiento de la presente invención es el único que presenta actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana debido a las altas cantidades de quercetina y 3-O-metilquercetina.

20 Debido a la presencia, en la composición, del extracto de marcela obtenido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención – que contiene altas concentraciones de quercetina y 3-O-metilquercetina – la composición cosmética y/o farmacéutica descrita en la presente memoria presenta actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana.

25 La composición cosmética y/o farmacéutica se puede usar en la prevención y tratamiento del acné, específicamente debido a sus actividades antiinflamatorias y antimicrobianas frente a *Propionibacterium acnes* y actividad antioxidante. Entre los ejemplos de daños que surgen a partir de las reacciones inflamatorias, microbianas y oxidativas se pueden citar: arrugas de expresión, signos de fotoenvejecimiento cutáneo, celulitis, acné, discromía de la piel y dermatitis tópica, hipersensibilidad de la piel (dermis), entre otros.

30 También, al presentar altas concentraciones de estos compuestos químicos, esta composición también se puede usar para la disfunción eréctil y para el tratamiento farmacológico del asma bronquial (la referencia se hace a artículos científicos enumerados más adelante).

35 Un extracto etanólico de inflorescencias de *Achyrocline satureioides* muestra actividad relajante en los músculos lisos del *corpus cavernosum* de cobaya. Esta actividad principalmente se debe a las moléculas de quercetina y 3-O-metilquercetina presentes en el extracto en 0,02% (m/m) y 0,07% (m/m), respectivamente. Estos compuestos, en una forma aislada, muestran la misma actividad relajante (Hnatyszyn et al., 2004). El mecanismo de acción de esta actividad proporcionada por 3-O-metilquercetina y supuestamente también por quercetina es la inhibición de la enzima fosfodiesterasa mediante el posterior incremento de los mediadores cAMP y cGMP, con reducción de la concentración de Ca intracelular (Ko, et al. 2001). En otro estudio, era evidente que la quercetina es un potente inhibidor de PDE 5A, con IC₅₀ de 1,9 μM, mientras que 3-O-metilquercetina es menos selectiva para esta enzima, con IC₅₀ de 86,9 μM (Lines & Ono, 2006). La inhibición de PDE 5A es el mismo mecanismo por el cual sildenafil ayuda a la vasodilatación, ayudando así a la erección en humanos que sufren de disfunción eréctil. Se puede concluir que la quercetina y la 3-O-metilquercetina contenidas en el extracto de *Achyrocline satureioides* están entre las moléculas responsables de la actividad relajante en el músculo liso del *corpus cavernosum* de cobaya y debido a esto podría ser un indicio para el uso del extracto estandarizado de *Achyrocline satureioides* citado en la presente invención en forma de una medicación para el tratamiento farmacológico de la disfunción eréctil en humanos.

45 En un modelo experimental *in vitro* de la actividad muscular relajante en tráqueas de cobaya, se mostró que la 3-O-metilquercetina es capaz de provocar la relajación del músculo liso de las tráqueas que están previamente contracturadas con histamina, carbacol, KCl y forskolina mediante el mecanismo de la inhibición enzimática competitiva de la fosfodiesterasa. Esta inhibición da como resultado la reducción de AMPc y GMPc con la posterior reducción de Ca⁺ intracelular, dando como resultado la relajación muscular (Ko et al., 2002). En otro estudio, se demostró que la 3-O-metilquercetina es un inhibidor dual de la fosfodiesterasa 3 y 4 (PDE3/4), más selectivo para PDE3 que para PDE4, con IC₅₀ respectivo de 1,6 μM y 28,5 μM. (Chiu & Chang, 1998 apud Ko et al., 2007). Los inhibidores duales de PDE 3/4 son más eficaces en el control del asma que los inhibidores simples de PDE4. Estos resultados indican que el extracto estandarizado obtenido de acuerdo con esta invención, puede ser indicado para usarse en productos farmacéuticos y veterinarios para el tratamiento farmacológico del asma bronquial y otras patologías que implican hipersensibilidad bronquial.

Los ejemplos más relevantes de los productos que se pueden preparar a partir del extracto de marcela obtenido mediante el procedimiento de la presente invención o a partir de las composiciones cosméticas y farmacéuticas que comprenden dicho extracto son:

- leche corporal hidratante;
- 5 - leche hidratante para la cara;
- loción corporal hidratante;
- loción hidratante para la cara
- geles;
- productos para el cuero cabelludo;
- 10 - protectores o bloqueadores solares para uso de adulto o niño, destinados o no destinados al uso concomitante en la práctica de deportes;
- hidratantes corporales o faciales;
- productos anti-mancha (cuidado de la piel) corporales o faciales;
- productos reafirmantes corporales o faciales;
- 15 - productos autobronceadores;
- productos repelentes de insectos;
- iluminadores de la piel hidratantes corporales o faciales;
- preparaciones farmacéuticas para la aplicación tópica;
- preparaciones cosméticas corporales o faciales para el uso de niños;
- 20 - preparaciones cosméticas de acción localizada, específicamente para la región periorcular, el contorno de labios, los labios, antimachas y antiojeras, entre otros;
- productos antiacné;
- productos para la aclarar la piel;
- composiciones farmacéuticas para el tratamiento de dermatosis específica;
- 25 - barra de labios y cacaos;
- coloretes y bases de maquillaje;
- polvos faciales
- cualquier producto de maquillaje para el área de los ojos;
- productos anticelulitis;
- 30 - productos para piel sensible;
- tónicos;
- dentífricos;
- enjuagues bucales.

Componentes de la composición:

- 35 Extracto de marcela:

El extracto de marcela se obtiene mediante un procedimiento de extracción de inflorescencias de *Achyrocline satureioides* de acuerdo con el procedimiento de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente.

Portador

5 El agua es la base de diversas composiciones cosméticas preferidas descritas en la presente memoria, actuando como el portador para los otros componentes. Las composiciones descritas en la presente memoria comprenden agua, preferiblemente desmineralizada o destilada, en un porcentaje apropiado (q.s) para alcanzar el 100% de la fórmula en base al peso total de la presente composición. Naturalmente, se pueden usar otros portadores cosméticamente aceptables.

Componentes opcionales:

10 Algunos ejemplos de adyuvantes cosméticos compatibles con las propiedades de la composición descrita en la presente memoria se enumerarán después más adelante – de una manera no restrictiva, solamente con propósitos demostrativos – los cuales, adicionalmente, se pueden emplear en la presente composición cosmética y/o farmacéutica destinada a la prevención y tratamiento de daños que surgen a partir de reacciones inflamatorias, microbianas y oxidativas/lipoperoxidativas:

- Agentes antioxidantes: BHT, tocoferol y/o sus derivados, catecoles, taninos y/o sus derivados, compuestos fenólicos e hidroquinonas, entre otros;
- 15 - Agentes conservantes: metilparabenos, propilparabenos, isotiazolinonas, fenoxietanol;
- Agentes formadores de película: goma de agar, goma de carragenano, alginatos, goma arábica, gelatina;
- Agentes formadores para una red microcristalina de sostén: dextranos, metilacrilatos, PHB, PHA;
- Agentes poliméricos y/o agentes copoliméricos: copolímeros de silicona, polímeros de siloxano y/o silicona modificada, copolímeros de acrilato;
- 20 - Agentes desnaturizantes: benzoato de denatonio;
- Agentes de consistencia: ceras vegetales, hidrocarbonatos minerales, parafina, cera de abeja, cera blanca, esperma de ballena, manteca de cacao, manteca de karité, cera de caña de azúcar;
- Emolientes: parafina líquida, aceite de palma, manteca de cupuaçu, lecitina, aminoácidos de leche, proteína de trigo, proteínas vegetales, aceites vegetales fosfolípidos, ceramidas, ceramidas de la fruta de la pasión, esfingolípidos, esperma de ballena, lanolina, aceite de almendra, carbonato de dicaprilo, elastómeros de silicona, ciclometicona;
- 25 - Agentes humectantes y/o agentes hidratantes: glicerina, propilenglicol, ácido hialurónico, urea, PCA;
- Agentes acondicionadores: sales de amonio cuaternarias, siliconas, siloxanos; y
- Activos.

30 La presente composición cosmética y/o farmacéutica presenta otras características físico-químicas que son apropiadas y seguras para el usuario del producto final:

1. Es estable durante un periodo de al menos dos años;
2. Tiene una textura apropiada durante la aplicación que es no pegajosa y no aceitosa;
3. Se extiende fácilmente;
- 35 4. No vuelve la piel aceitosa después de la aplicación;
5. No presenta comedogenicidad;
6. No presenta fototoxicidad y citotoxicidad;
7. No presenta alergenicidad;
8. No es sensibilizante;
- 40 9. No provoca ningún tipo de reacción adversa o lesión cutánea u ocular, en condiciones normales de uso o en condiciones de transpiración forzada;
10. Presenta un nivel excelente de homogeneidad y estabilidad;
11. Al no provocar irritación a la piel, llega a ser más comfortable y permite usarse diariamente o incluso más de una vez al día;

- 12. Presenta estabilidad química apropiada;
- 13. Comprende un extracto multifuncional de marcela que presenta actividades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias. También presenta bajo coste en la preparación de la composición ya que prescinde de la adición de antioxidantes y conservantes complejos;
- 5 14. El extracto de marcela presenta un color y olor agradable que no impacta sobre el resultado final de la composición;
- 15. El extracto presenta características sensoriales (suavidad, textura y brillo) que son ideales para las composiciones cosméticas de uso tópico;
- 10 16. El extracto combate la inflamación específica inducida por los componentes químicos presentes en la membrana de *Propionibacterium acnes*.

Ejemplo de una composición cosmética y/o farmacéutica que comprende un extracto de marcela:

- Los siguientes ejemplos son realizaciones preferentes de composiciones cosméticas y/o farmacéuticas destinadas a la prevención y tratamiento del daño que surge de las reacciones inflamatorias, microbianas y oxidativas y no deberían, por lo tanto, interpretarse como limitaciones de las mismas. En este contexto, se debería entender que el alcance de la presente invención tiene otras realizaciones posibles y está limitado por el contenido de las reivindicaciones adjuntas, incluyendo todos los equivalentes posibles en las mismas.

En la tabla 5 se describe un ejemplo de una realización (formulación) de la composición cosmética y/o farmacéutica, objeto de la presente invención:

Ejemplo 1: loción astringente con marcela

20 Tabla 5:

Fase	Componente	Cantidad (% en masa)
1	Glicerina bidestilada vegetal	2,00
1	Agua desmineralizada	Qs
1	Glycereth-26	3,00
2	Zinc pca	0,75
3	Ácido salicílico	0,50
3	Agua desmineralizada	5,00
3	Extracto de marcela	0,10
3	Alcohol etílico neutro hidratado orgánico	20,00
3	Disolución de benzoato de denatonio 20% p/v	0,0006
4	Aceite de ricino hidrogenado	2,00
5	Tocoferil acetato	0,25
5	Fragancia	0,10
5	Alfa bisabolol natural certificado	0,50
5	Metil-4-isotiazolin-3-ona	0,07
5	Fenoxietanol	0,40
6	Agua desmineralizada	3,00
6	Hidróxido de sodio	0,05

Preparación de la composición cosmética del ejemplo 1

- a. homogenizar los componentes de la fase 1;
- b. añadir a la fase obtenida en (a) los componentes de la fase 2 y homogenizar;
- c. añadir a la fase obtenida en (b) los componentes previamente solubilizados de la fase 3 y homogeneizar;
- 5 d. calentar los componentes de la fase 4 hasta que estén completamente solubilizados y a continuación enfriar;
- e. cuando la temperatura es menor de 40°C, solubilizar los componentes de la fase 5 sobre la fase 4 y añadir a la fase principal (obtenida en (c)) y homogeneizar;
- 10 f. añadir los componentes previamente solubilizados de la fase 6 en agua a la fase obtenida en (e) y homogeneizar.

Referencias bibliográficas

- CARNEY, J.R. et al. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. *J. Nat. Prod.*, 65(2): 203-205, 2002.
- 15 CHAN AL, Huang HL, Chien HC, Chen CM, Lin CN, Ko WC. Inhibitory effects of quercetin derivatives on phosphodiesterase isozymes and high-affinity [(3) H]-rolipram binding in guinea pig tissues. *Invest New Drugs*. Oct;26(5):417-24, 2008,
- D'ÁVILA, M.C. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul. Dissertação Faculdade Livre de Medicina e Farmácia de Porto Alegre, 1910. Porto Alegre. 155 pp. (Medicinal flora of Rio Grande do Sul. Dissertation Faculty of Medicine and Pharmacy of Porto Alegre)
- 20 HNATYSZYN, O. et al. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine*, 11(4): 366-369, 2004.
- IKUTA, A.R.Y. Estudos sobre Propagação de marcela *Achyrocline satureioides* (Lam.) (Studies on the propagation of marcela, *Achyrocline satureioides* (Lam.)) D.C., Composite. 205 p. Dissertation (Master's Degree in Plant Science) - Master's Course in Plant Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.
- 25 JIANG, J.-S. et al. Potent suppressive effects of 3-O-methylquercetin 5,7,3',4'-O-tetraacetate on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. *Planta Medica* 73(11):156-1162, 2007.
- KADARIAN, C. et al. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. *Pharmacol. Res.*, 45(1): 57-61, 2002.
- 30 KO WC, Wang HL, Lei CB, Shih CH, Chung MI, Lin CN. Mechanisms of relaxant action of 3-O-methylquercetin in isolated guinea pig trachea. *Planta Med*. Jan;68(1):30-5, 2002
- LEMOS, G.C.S. Bacterial activity of macela (*Achyrocline satureioides*) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis *Rev. Bras. Pl. Med.*, 3(1): 67-72, 2000.
- LINES, T.C.; ONO, M. FRS 1000, an extract of red onion peel, strongly inhibits phosphodiesterase 5a (pde 5a). *PHYTOMEDICINE*, v.13, n.4, p. 236-239,2006.
- 35 MARQUES, F.C. & Barros, I.B.I. Crescimento inicial de marcela (*Achyrocline satureioides*) em ambiente protegido (Initial growth of marcela (*Achyrocline satureioides*) in a protected environment). *Rural Science*, 31(1): 517-518, 2001.
- MARQUES, F.C. & Barros, I.B.I. Qualidade de sementes de marcela (*Achyrocline satureioides*) provenientes de duas populações do Rio Grande do Sul (Quality of seeds of marcela (*Achyrocline satureioides*) from two populations of Rio Grande do Sul). *Rural Science*, 30(2): 241-247, 2000.
- 40 MARQUES, F.C. Análise da qualidade de sementes de marcela (*Achyrocline satureioides*) (Lam.) D.C. (Asteraceae)provenientes de duas populações do Rio Grande do Sul (Analysis of the quality of seeds of marcela, *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. (Asteraceae), from two populations of Rio Grande do Sul). 143 p. Dissertation (Master's Degree in Plant Science) - Master's Course in Plant Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.
- 45 MEDEIROS, M. F.T.; et al Regina Helena P. Flora medicinal dos sitiantes da Reserva Particular do Patrimônio Natural das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil:taxonomia e aspectos etnobotânicos (Medicinal flora of the farms of the Private Reserve of Natural Heritage, Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Taxonomy and ethnobotanic aspects.) *Publ. A-vul. Mus. Nac.*, Rio de Janeiro, n.106, p. 3-24, Mar. 2005.

OLIVEIRA, A.L. et al. *Achyrocline satureioides*, Asteraceae, comparative evaluation of the plant ingredient and preliminary studies of the optimization of extraction. *Pharmacy Notebook*, 17(1): 33-38, 2001.

5 PARDO, V.A. Estaquia de marcela *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. sob diferentes períodos de enraizamento e doses de ácido indolbutírico (Staking of marcela *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. under different periods of root planting and doses of indolebutyric acid). 78p. Dissertation (Master's Degree in Plant Science) - Master's Course in Plant Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

RITTER et. al. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê. (Plants used as medicines in the municipality of Ipê), RS. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 12(2): 51-62, 2002.

10 SIMÕES, C.M.O. Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically. *Fitoterapia*, 59(5): 419-421, 1988.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de extracción para obtener un extracto estandarizado de quercetina y 3-O-metilquercetina a partir de inflorescencias de marcela (*Achyrocline satureioides*) caracterizado por comprender las siguientes etapas:
 - A) moler las inflorescencias de *Achyrocline satureioides* para obtener un material de planta molida;
 - 5 B) someter la planta molida a al menos cuatro fases secuenciales de extracción hidroalcohólica a una temperatura de 60°C a 80°C, durante 3 a 4 horas para cada fase, para obtener 4 extractos hidroalcohólicos intermedios;
 - C) combinar los 4 extractos hidroalcohólicos intermedios;
 - D) 10 concentrar la mezcla de extractos hidroalcohólicos intermedios; para obtener hasta un máximo de 20% de la masa inicial de los extractos hidroalcohólicos intermedios;
 - E) secar el material obtenido en (D).
2. El procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa B las fases secuenciales de la extracción hidroalcohólica se llevan a cabo bajo reflujo, durante 12 horas y comprende las siguientes fases:
 - 15 i) someter a extracción el extracto intermedio con una disolución hidroalcohólica 1:30 (m/m de material de planta molida/disolución de extracción) durante un periodo de 3 a 4 horas, preferiblemente durante al menos 3 horas, a una temperatura en el intervalo de 60 a 80°C, preferiblemente a 80°C, para obtener una primera disolución extraída;
 - 20 ii) volver a someter a extracción el extracto hidroalcohólico de (i) con una disolución hidroalcohólica en la proporción de 1:20 (m/m de fármaco de planta/disolución de extracción) durante un periodo de 3 horas a una temperatura de 80°C obteniendo así una segunda disolución extraída;
 - iii) combinar la primera y la segunda disolución extraída para obtener una tercera disolución extraída;
 - iv) 25 someter a extracción un lote fresco de planta molida con dicha tercera disolución extraída en la proporción de 1:30 (m/m de ingrediente de planta molida/disolución extraída de las fases 1 y 2) durante un periodo de 3 horas a una temperatura de 80°C;
 - v) volver a someter a extracción el extracto hidroalcohólico de la fase (iv) con una disolución hidroalcohólica en la proporción de 1:16 (m/m de extracto hidroalcohólico/disolución de extracción) durante 3 horas a 80°C para obtener una disolución extraída final.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa C se lleva a cabo en un 30 concentrador al vacío a temperatura de 60°C y una presión de 79,99 kPa (600 mmHg).
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha disolución extraída final es 5 veces más concentrada que la disolución inicial.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa D se añade un 35 portador apropiado para rociar en una proporción de 50% en masa y el posterior secado se lleva a cabo en un secador por pulverización.

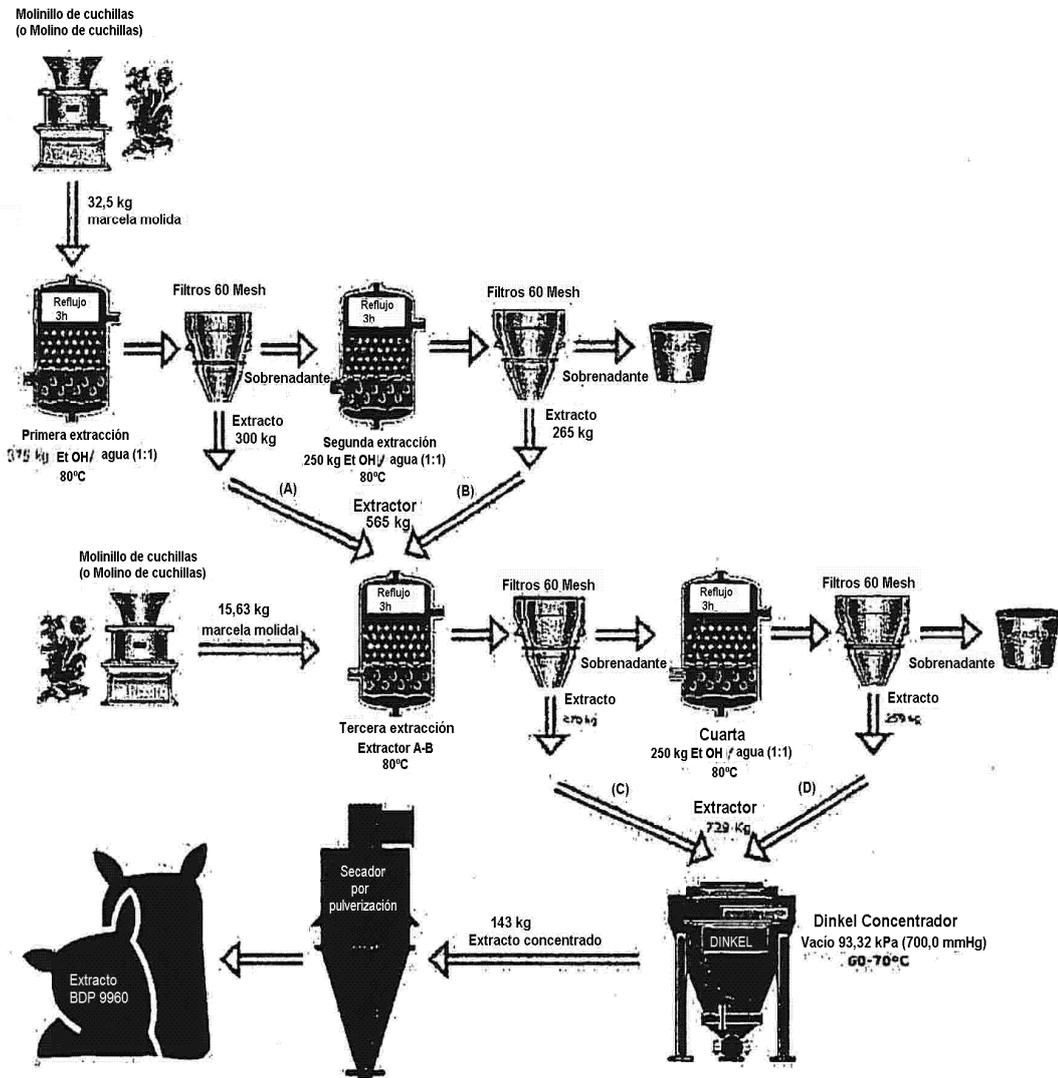


FIG. 1

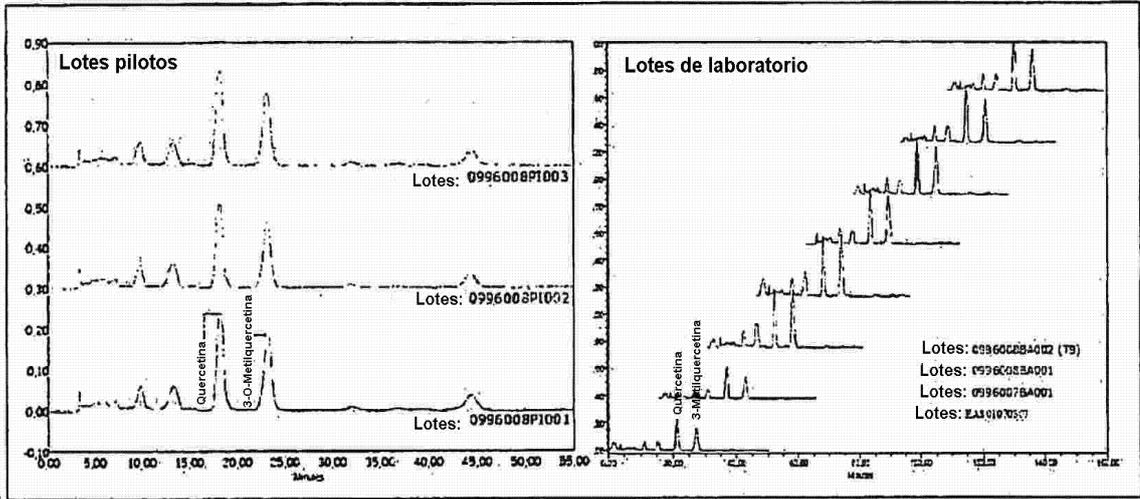


FIG. 2

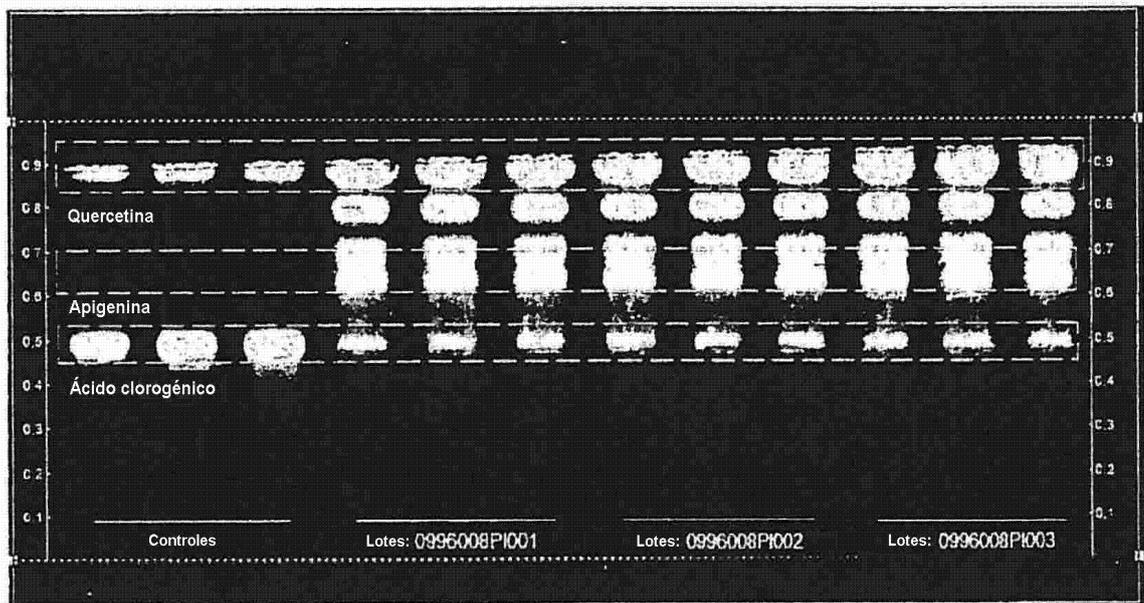


FIG. 3

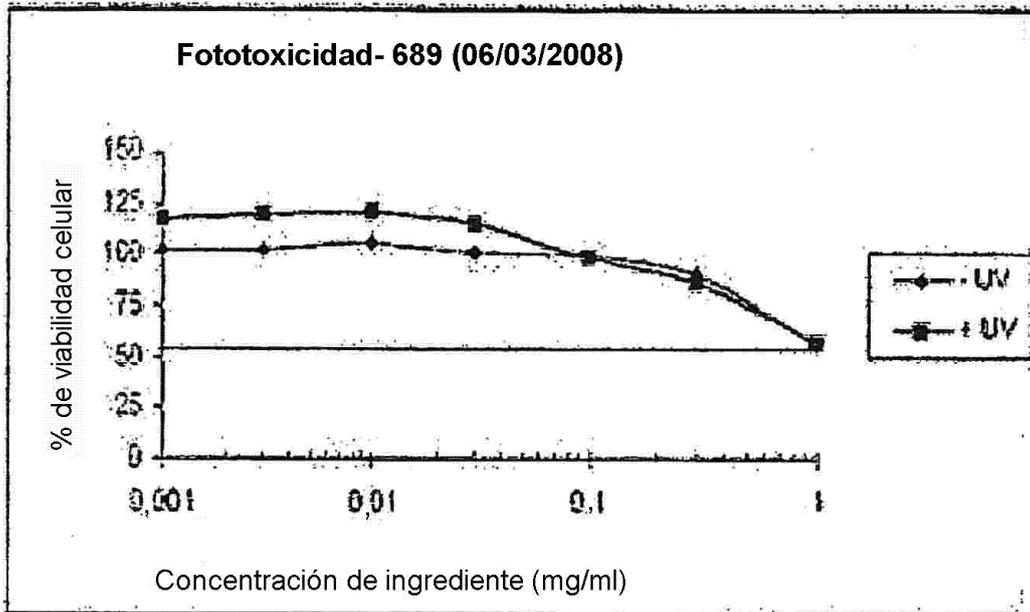


FIG. 4

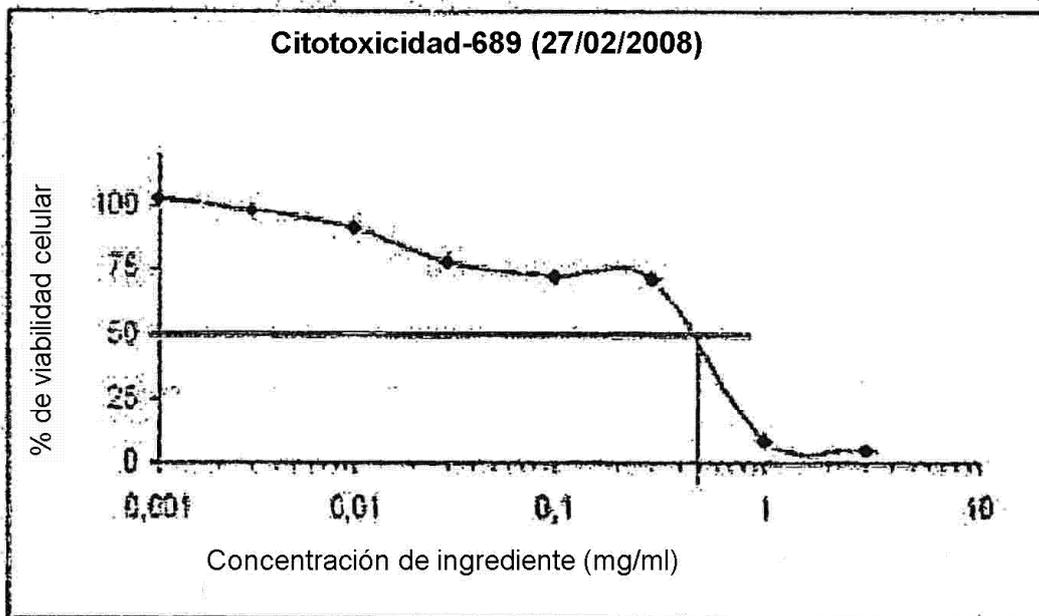


FIG. 5

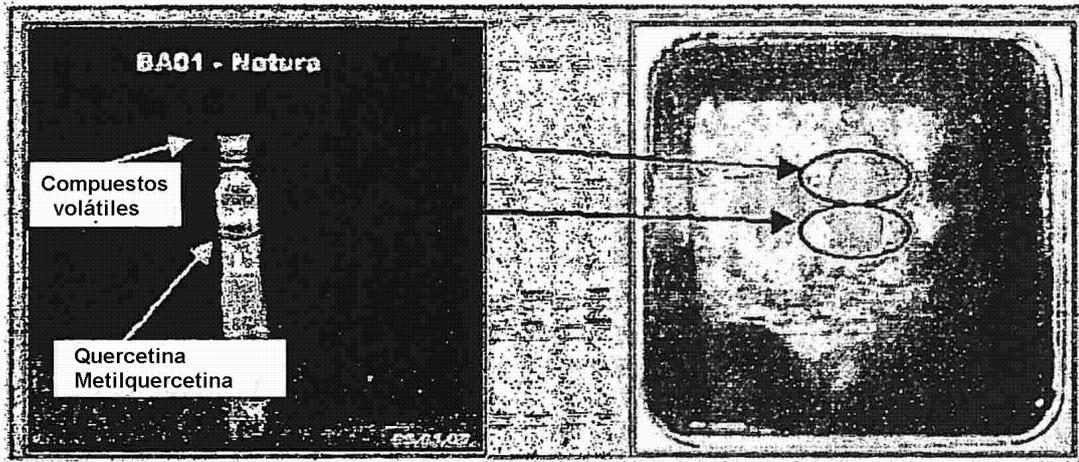


FIG. 6

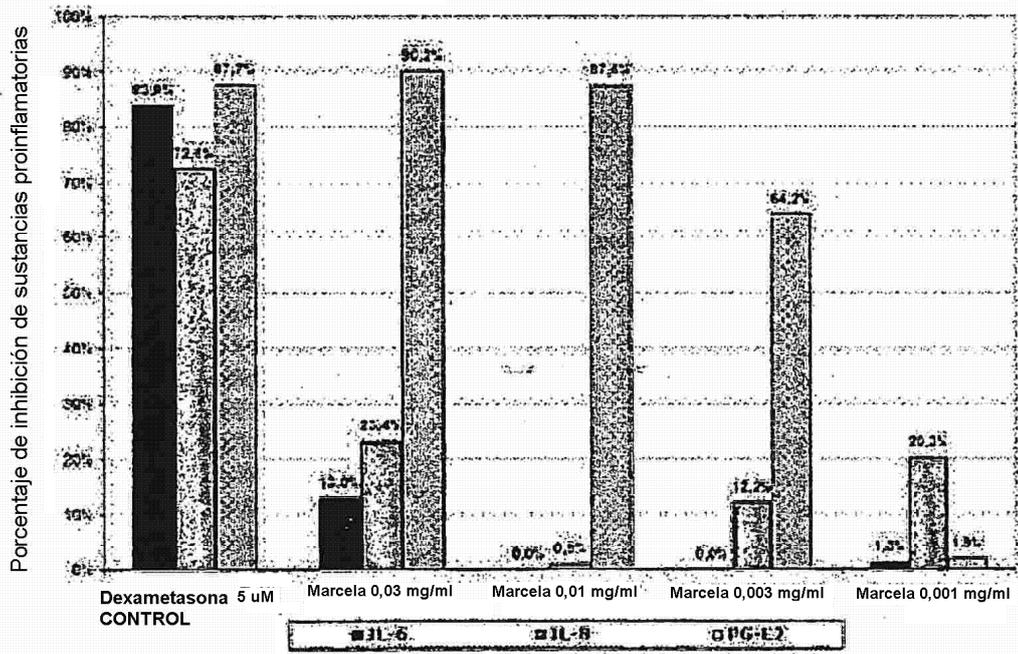


FIG. 7

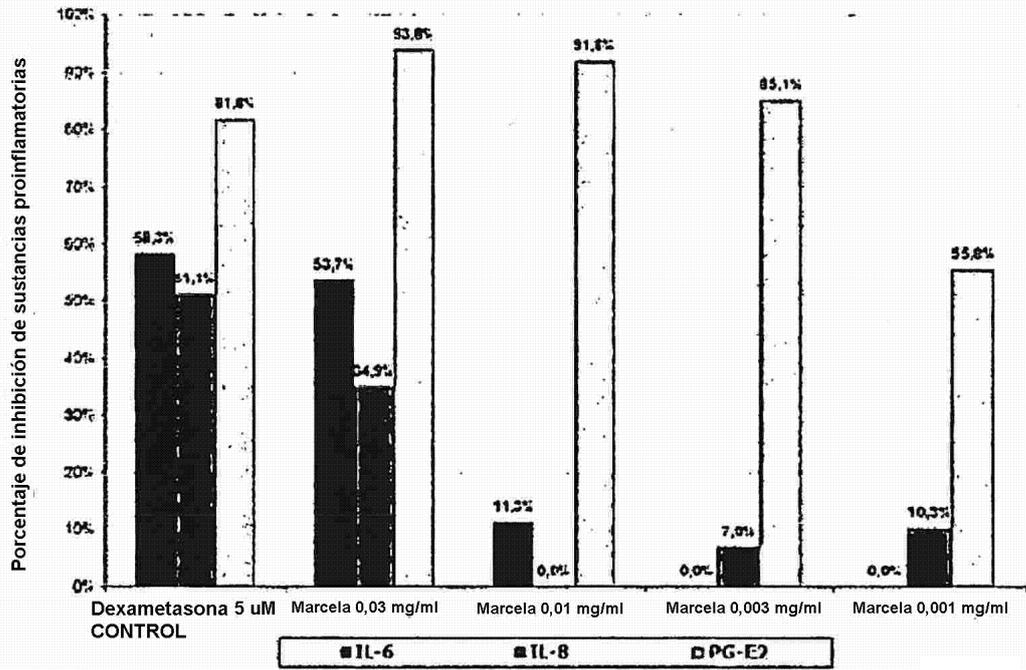


FIG. 8

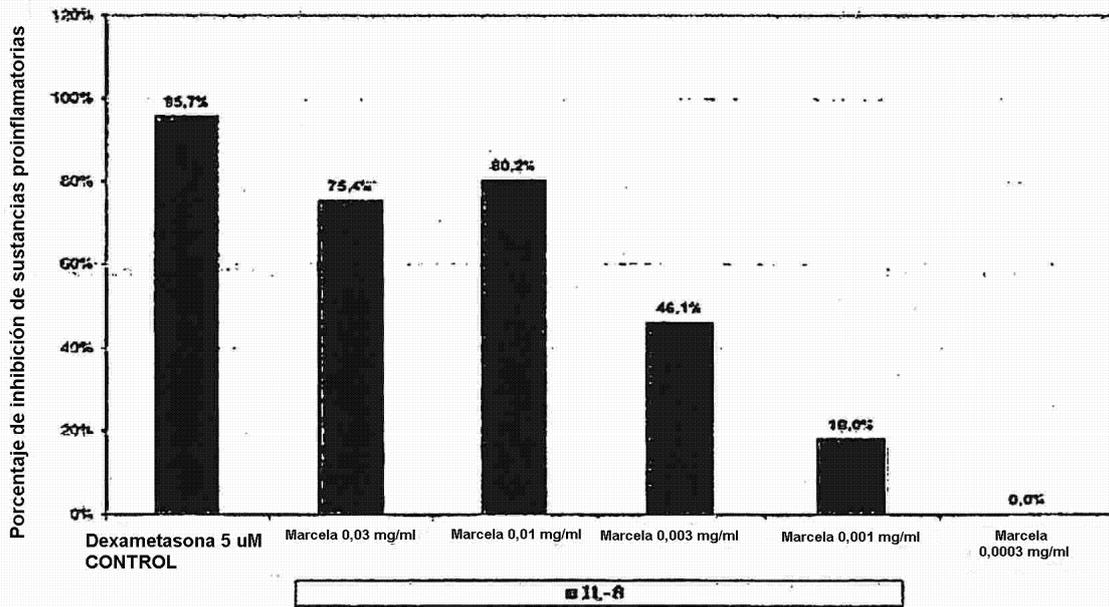


FIG. 9

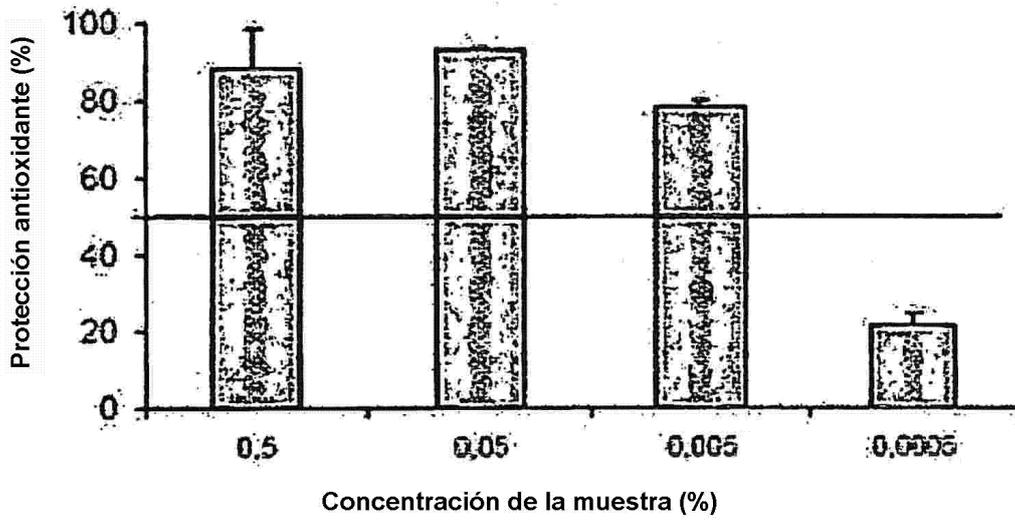


FIG. 10

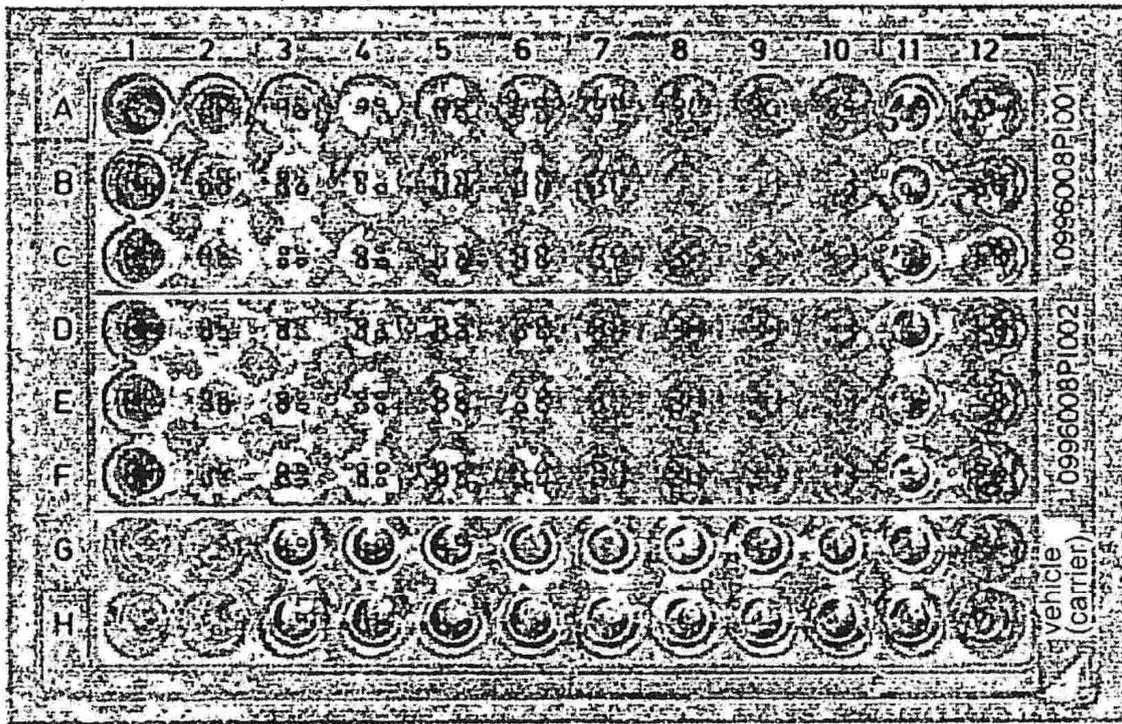


FIG. 11

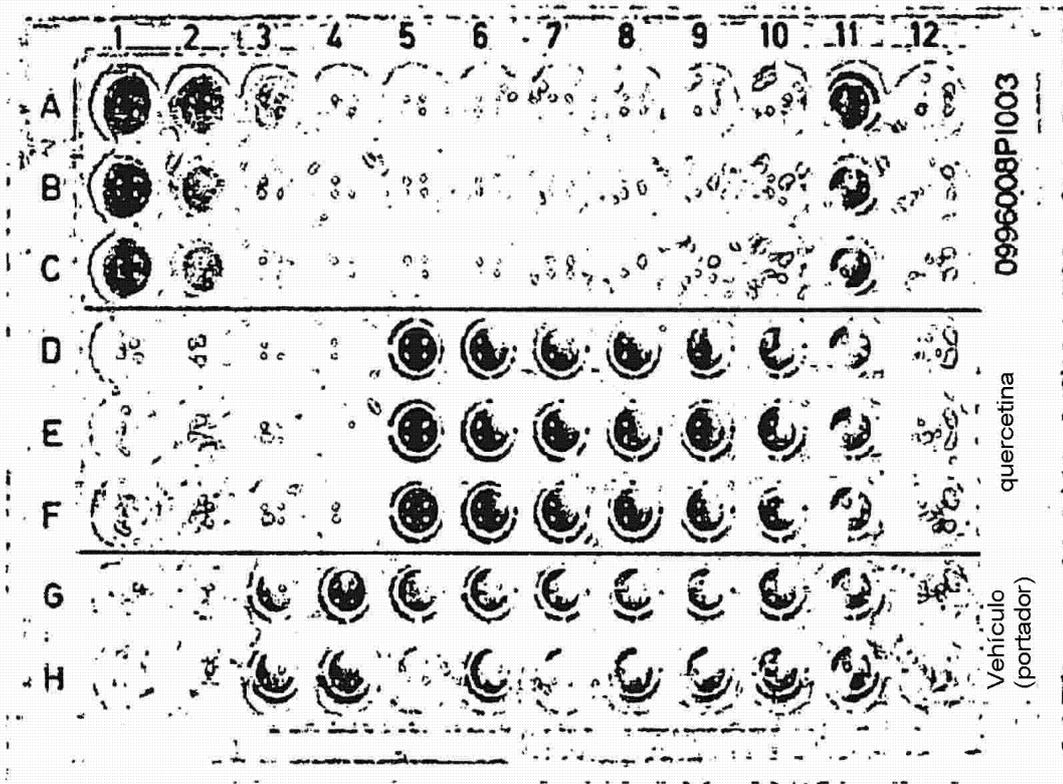


FIG. 12