

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 963**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)
A61K 8/00 (2006.01)
C12R 1/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61K 8/368 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A61K 8/365 (2006.01)
A61K 8/99 (2006.01)
A23L 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2013 E 13711696 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2830609**

54 Título: **Ácido 4-oxo-2-pentenoico y pigmentación de la piel**

30 Prioridad:

30.03.2012 EP 12162361

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

03.06.2016

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
CT-IAM, Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**ARCE VERA, FRANCIA JACQUELINE;
BOURQUI, BERTRAND;
BUETLER, TIMO;
DUBOUX, STÉPHANE;
FOATA, FRANCIS;
GUITARD, MARJORIE;
GUY, PHILIPPE ALEXANDRE;
PAGE, NICOLAS y
REZZI, SERGE ANDRÉ DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 572 963 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

Ácido 4-oxo-2-pentenoico y pigmentación de la piel

5 La presente invención, se refiere, de una forma general, al sector de la mejora de la apariencia de la piel. Un aspecto de la presente invención, tiene como objetivo el proporcionar una composición, la cual comprende el ácido 4-oxo-2-pentenoico, para su uso en la reducción o la prevención de las regiones de la piel con una pigmentación más oscura. La presente invención, se refiere así mismo, también, a uso cosmético de una composición, la cual comprende el ácido-4-oxo-2-pentenoico, para la reducción o para la prevención de las regiones de la piel con una pigmentación
10 más oscura.

La piel, es el órgano más grande y extenso del cuerpo humano. Éste es nuestra primera línea de defensa contra el entorno medioambiental, protegiendo al cuerpo contra los microorganismos patogénicos y evitando una pérdida excesiva de agua. Debido a su organización estructural y a la gran variedad de células a partir de las cuales se encuentra éste constituido, la piel, asegura un amplio espectro de las funciones biológicas, incluyendo la curación de las heridas, la respuesta inmune, la regulación de la temperatura corporal y la producción de la vitamina D. La piel, se encuentra también involucrada en la protección contra el sol, mediante las células melanocitos, las cuales producen la melanina, un pigmento marrón en la piel.
15

El color de la piel, se determina, en primer lugar, por mediación de la cantidad y del tipo de la melanina. Unas cantidades disminuidas de melanina, tienen como resultado un color de la piel más oscuro. La hiperpigmentación de la piel, viene provocada por la sobreexpresión o acumulación de melanina en la piel. Como resultado de ello, la trayectoria involucrada en la producción de la melanina, ha venido siendo el objetivo, para muchos inhibidores, para que se reduzcan los niveles producidos. Una de las principales enzimas involucradas en la trayectoria de la melanina, es la consistente en la tirosinasa, la cual cataliza la producción de melanina, a partir de la tirosina, mediante oxidación.
20
25

La síntesis de la melanina, es un proceso bajo control hormonal, incluyendo a la hormona de la estimulación de los melanocitos, y a los péptidos de hormonas adrenocorticotrópicas, los cuales se producen a partir del precursor pro-opiomelanocortina. Ésta se estimula así mismo, también, mediante la radiación UVB, a través de la regulación transcriptómica de la tirosinasa.
30

La capacidad para modificar la expresión del contenido de pigmento en la piel, para fomentar un tono uniforme de la piel, es hoy en día altamente deseable, en muchas sociedades. Una inquietud usual, es la que se refiere a las regiones de la piel, las cuales tienen una pigmentación, la cual no se adapta a la piel circundante, tales como, por ejemplo, las consistentes en los lunares, en las marcas de nacimiento, en las pecas, en las manchas inherentes a la edad, o en la desaparición delimitada de la pigmentación de la piel por vitiligo. Otras personas, desean reducir el oscurecimiento de la piel, provocado por la exposición al sol. Con objeto de poder satisfacer estas necesidades, se han realizado varios intentos de desarrollar composiciones, las cuales reduzcan o prevengan la pigmentación de la piel, pero, no obstante, las composiciones las se han desarrollado hasta ahora, tienden a tener una reducida eficiencia, unos efectos secundarios no deseables, o ambas cosas a la vez. Una revisión de los diferentes agentes los cuales, según se conoce, provocan una hipopigmentación (pérdida del color de la piel, es la que se ha publicado por parte de F. Solano et al. (véase, a dicho efecto, Solano et al., Pigment Cell Research, 19, 550 – 571 (2006)).
35
40

Durante más de cincuenta años, se sabe ha venido sabiendo el hecho de que, la hidroquinona, reduce la pigmentación, cuando ésta se aplica a la piel. La hidroquinona, inhibe la producción de la melanina, entre otras cosas, mediante la inhibición de la acción de la tirosinasa. De una forma lamentable, la hidroquinona, puede tener desventajas, debido a su citotoxicidad, y a los efectos laterales, tales como los consistentes en la irritación de la piel. La hidroquinona, se encuentra prohibida en un gran número de países, para los pronósticos generales cosméticos.
45
50

Otras preparaciones externas mediante las cuales se ha pretendido reducir la pigmentación de la piel, incluyen al ácido kójico, al ácido ascórbico, al peróxido de hidrógeno, al azufre coloidal, y a la monobenzona. La Monobenzona, es el mono(éster bencílico) de la hidroquinona. Sin embargo, no obstante, estos agentes, se tratan de agentes los cuales no son deseables, debido al hecho de sus posibles problemas consistentes en la estabilidad y / o la seguridad. El ácido kójico, de la misma forma que la hidroquinona, es un inhibidor de la tirosinasa, pero ésta, puede tener, no obstante, unos efectos secundarios no deseables, tales como los consistentes en la alergia y en la irritación de la piel, y a menudo, ésta no es deseable en las formulaciones cosméticas. El ácido ascórbico, el cual se utiliza, algunas veces, para la prevención o para la reducción de la pigmentación, puede fácilmente oxidarse, y a menudo, éste es inestable, en las composiciones, con unos altos contenidos de agua, tales como las consistentes en las composiciones cosméticas. El ácido ascórbico, puede también causar unos efectos adversos, ya que éste puede inducir un gran incremento de los radicales libres, en presencia de trazas de iones metálicos. Las soluciones de peróxido de hidrógeno, pueden tener problemas de preservación o mantenimiento de la estabilidad y de la seguridad. El azufre coloidal, tiene un olor inusual, y éste puede ser dificultoso de utilizar, como un componente de los agentes de aclarado de la piel. La monobenzona, puede provocar la destrucción de los melanocitos, y la despigmentación permanente de la piel. El monobencilo, no es recomendable, para las condiciones de la piel, distintas al vitiligo.
55
60
65

Los retinoides tópicos y los corticosteroides tópicos, son compuestos los cuales se ha sugerido como siendo agentes hipopigmentantes, tal y como también se han sugerido los tratamientos consistentes en el tratamiento por láser, y en los tratamientos químicos de la piel del tipo "peeling" (exfoliación química de la piel). Las composiciones de aclarado de la piel, las cuales tienen un alto contenido en inhibidor acetilcolinestearasa, se han descrito en documento de publicación de la patente internacional WO 2010 / 066 639.

Las materias naturales, se han venido utilizando, desde hace muchos siglos, en Asia y en Europa en intentos o procedimientos para blanquear o aclarar la piel, o para mejorar la apariencia de clara de la piel. Estos intentos o procedimientos, incluyen el uso del limón, de la naranja, del pepino, del ginkgo, de las algarrobas, del fruto de la rosa, de la hierba de geranio, de la canela, de la mejorana dulce, y del romero.

Con objeto de combatir contra los trastornos o desórdenes los cuales se encuentran relacionados con la pigmentación anormal o para aclarar el tono de la piel, se han venido propuesto diversos compuestos, los cuales reducen la actividad tirosinasa, cuando éstos se aplican de una forma tópica sobre la piel. Lamentablemente, los tratamientos los cuales se encuentran disponibles en la actualidad, no son enteramente satisfactorios, de una forma particular, en términos de efectos secundarios, tales como los consistentes en la irritación de la piel, la cual puede acontecer con determinados agentes tópicos.

Así, de este modo, sería altamente deseable, el hecho de poder disponer de composiciones adicionales, las cuales se encuentren disponibles, y las cuales reduzcan o prevengan regiones de la piel, con una pigmentación más oscura, sin los inconvenientes inherentes a algunas de ellas, pertenecientes al arte especializado anterior de la técnica, y con objeto de ampliar los márgenes de las opciones de tratamiento disponibles, y así de este modo, mejorar la elección y la adaptación a las necesidades personales. De una forma particular, sería deseable el hecho de encontrar una composición efectiva, cuyo ingrediente activo, se obtenga de una fuente natural.

El objeto de la presente invención, es el de mejorar el estado actual del arte especializado de la técnica, y de una forma particular, el de proporcionar una composición para su uso en la reducción o en la prevención de las regiones de la piel con una pigmentación más oscura, superando, con ello, por lo menos algunas de las desventajas las cuales se han descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente.

Los inventores, se sorprendieron del hecho de ver que, el objeto de la presente invención, podía lograrse mediante el contenido específico el cual se expone en las reivindicaciones independientes anexas a este documento de solicitud de patente. En las reivindicaciones dependientes, se reivindica, de una forma adicional, el desarrollo de la idea de la presente invención.

Se ha encontrado, de una forma sorprendente, por parte de los presentes inventores, el hecho consistente en que, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, suprime, de una forma efectiva, la producción de la melanina. Los inventores, han encontrado así mismo, también, el hecho consistente en que, la producción de la tirosinasa, una enzima involucrada en la primera etapa de la síntesis de la melanina, se reduce, mediante el ácido 4-oxo-2-pentenoico.

Los presentes inventores, ser sorprendieron así mismo, también, del hecho consistente en encontrar que, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, era susceptible de poderse obtener a partir de algunas cepas bacterianas. Así, por ejemplo, las preparaciones bacterianas de *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865 y de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700™, proporcionaban, ambas, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, cuando éstas se calentaban, durante un transcurso de tiempo de horas, a una temperatura de 90 °C. Se encontró el hecho consistente en que, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, se encontraba en la fracción soluble, después de haber procedido a la centrifugación y al filtrado de las preparaciones bacterianas tratadas mediante calor.

El *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865, se depositó en la entidad COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM), INSTITUT PASTEUR, (Colección nacional de cultivos y de microorganismos (CNCM) – Instituto Pasteur), 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS Cedex 15, Francia, en fecha 15 de Noviembre del 2007.

El *Bifidobacterium breve* ATCC 15700™, puede obtenerse comercialmente, en el mercado, por ejemplo, de procedencia de la entidad estadounidense American type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, USA, bajo la marca comercial de ATCC 15700.

Así, por consiguiente, la presente invención, se refiere, en parte, a una composición que comprende el ácido 4-oxo-2-pentenoico, en la preparación de una composición para la reducción o la prevención de las regiones de la piel, con pigmentación más oscura.

La presente invención, se refiere así mismo, también, al uso del ácido 4-oxo-2-pentenoico, en la preparación de una composición para la reducción o la prevención de las regiones de la piel, con pigmentación más oscura.

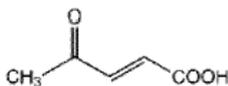
Las regiones de la piel con una pigmentación oscura, pueden ser el resultado de unas condiciones de la piel, relacionadas con una lesión o herida, o con una inflamación, de cortes, de quemaduras o de brotes de acné, y la

reducción de la pigmentación de la piel más oscura, puede considerarse, por lo tanto, como una etapa de restauración o restablecimiento de una medida terapéutica.

5 La pigmentación oscura de la piel es, de una forma usual, el resultado de la acumulación de melanina, en áreas localizadas – una condición denominada hiperpigmentación -. La hiperpigmentación, se encuentra asociada con un gran número de enfermedades incluyendo a la enfermedad de Addison, a la enfermedad de Cushing, a la acantosis nigricans, y a la enfermedad tiroidea. La prevención de la hiperpigmentación, es así, por lo tanto, una aplicación profiláctica de la presente invención.

10 Así, por consiguiente, la composición de la presente invención, puede ser para un uso terapéutico. La composición la cual comprende el ácido 4-oxo-2-pentenoico, puede ser para un uso en la reducción o en la prevención de regiones de la piel con una pigmentación más oscura, resultantes de unas condiciones seleccionadas de entre el grupo consistente en el piebaldismo, en el vitiligo, en la lesión o inflamación relacionada con las condiciones de la piel, en la enfermedad de Addison, en la enfermedad de Cushing, en la acantosis nigricans, y en la enfermedad tiroidea. El vitiligo, es una condición la cual provoca la despigmentación de secciones de la piel. En casos de vitiligo, 15 las regiones de la piel con una pigmentación más oscura, en concordancia con la presente invención, pueden ser las consistentes en las áreas no afectadas.

20 El ácido 4-oxo-2-pentenoico, tiene el número de CAS 4743 – 82 – 2, y la siguiente fórmula:



25 La “reducción de las regiones de la piel con una pigmentación más oscura”, se entenderá como pretendiendo dar a entender el hecho de una reducción, en el área total de las regiones de la piel con una pigmentación más oscura y / o una reducción en el número de regiones de la piel con una pigmentación más oscura y / o una reducción en la oscuridad de la pigmentación de tales tipos de regiones de la piel. La “prevención de la regiones de la piel con una pigmentación más oscura”, se entenderá como incluyendo la prevención completa o la prevención parcial, de la 30 formación de regiones de la piel, con una pigmentación más oscura. Las regiones de la piel, no se encuentran limitadas, en cuanto a lo referente a su tamaño, y éstas pueden extenderse sobre la totalidad de la superficie del cuerpo.

35 La presente invención, proporciona así mismo, también, el uso no terapéutico de una composición, la cual comprende el ácido 4-oxo-2-pentenoico. Una forma de presentación de la presente invención, puede ser la consistente en el uso de una composición la cual comprende el ácido 4-oxo-2-pentenoico, para la reducción o para la prevención de regiones de la piel con una pigmentación más oscura.

40 La presente invención, puede proporcionar el uso cosmético el ácido 4-oxo-2-pentenoico, en el aclarado de la piel. El aclarado de la piel, es el acto de reducir el grado total de la pigmentación de la piel, en regiones de la piel. El aclarado de la piel, puede considerarse como siendo deseable, por parte de algunas personas, con objeto de invertir los efectos de la exposición al sol, o para seguir modas para una piel más clara, hecho éste, el cual acontece en determinadas culturas.

45 La presente invención, puede proporcionar, de una forma adicional, el uso cosmético del ácido 4-oxo-2-pentenoico, en la reducción o en la prevención de regiones de la piel con una pigmentación más oscura, en donde las regiones de la piel con una pigmentación más oscura, se seleccionan de entre el grupo consistente en los lunares, en la marcas de nacimiento, en el melasma, en las pecas, en las manchas inherentes a la edad, o combinaciones de entre éstos. Esto es ventajoso, ya que, una tez exenta de imperfecciones de pigmentación de la piel, se considera como 50 siendo estéticamente deseable, por parte de muchas personas.

55 En la presente invención, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, puede ser susceptible de poderse obtener, por ejemplo, procediendo a su obtención a partir de fuentes naturales. Muchas personas, se preocupan a propósito de la seguridad de las materias o materiales los cuales se sintetizan a partir de primeras materias químicas, de una forma especial, cuando las materias o materiales en cuestión, están previstos para ser ingeridos, y prefieren así, de este modo, materias o materiales de origen natural.

60 De una forma sorprendente, los presentes inventores, han encontrado el hecho consistente en que, algunas cepas de bacterias, proporcionan una fuente natural de obtención del ácido 4-oxo-2-pentenoico. De una forma particular, los presentes inventores, han encontrado el hecho consistente en que, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, puede obtenerse a partir de las bacterias *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865 ó *Bifidobacterium breve* ATCC 15700™ (el tipo de cepa para *Bifidobacterium breve*). Es particularmente ventajoso, el hecho de utilizar bacterias, como fuente para el ácido 4-oxo-2-pentenoico, ya que, la producción de grandes cantidades de ácido 4-oxo-2-pentenoico, es susceptible de poderse llevar a cabo, por ejemplo, mediante la utilización de biorreactores. De una forma 65 correspondientemente en concordancia, en la presente invención, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, es susceptible de

poderse obtener, por ejemplo, a partir de las bacterias *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865 ó *Bifidobacterium breve* ATCC 15700™.

5 Las bacterias en cuestión, pueden tratarse mediante calor, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 60 – 180 °C, llevándose a cabo, dicho tratamiento por calor, de una forma preferible, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 80 – 160 °C, tal como, por ejemplo, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 110 – 160 °C, y en un transcurso de tiempo el cual sea aceptable. Sin pretender ligarlo a ninguna teoría, se entenderá el hecho consistente en que, al proceder a aumentar la temperatura del tratamiento, se incrementa la tasa de
10 formación del ácido 4-oxo-2-pentenoico, pero sin embargo, no obstante, entonces, aumenta también la tasa de su degradación. De una forma correspondientemente en concordancia, estas temperaturas, proporcionan un buen equilibrio entre la tasa de formación del ácido 4-oxo-2-pentenoico, y su degradación.

15 Las composiciones típicas las cuales comprenden al ácido 4-oxo-2-pentenoico, pueden comprender el ácido 4-oxo-2-pentenoico, en una cantidad correspondiente a un valor de 1 mg / kg, de la composición. De una forma generalizada, se prefiere el hecho consistente en que, la composición en cuestión, comprenda el ácido 4-oxo-2-pentenoico, en una cantidad correspondiente a un valor de por lo menos 10 mg / kg, de la composición, tal como por ejemplo, la correspondiente a una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los 50 mg por kg de la composición, hasta los 50 g por kg de la composición.

20 La cantidad óptima de ácido 4-oxo-2-pentenoico, a ser administrada, puede determinarse, de una forma fácil, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica.

25 En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones, se administran en una cantidad la cual sea suficiente como para curar, o para detener, por lo menos parcialmente, los síntomas de un desorden o trastorno y / o sus complicaciones. Una cantidad la cual sea apropiada para lograr este objetivo, se define como “una dosis terapéuticamente efectiva”. Las cantidades efectivas para este propósito, dependerá de un gran número de factores, los cuales se conocen bien, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, así como también dependerán de la gravedad o trastorno y del peso y del estado general del paciente.

30 En las aplicaciones profilácticas, las composiciones en concordancia con la presente invención, se administran, a un paciente, el cual sea susceptible de poder sufrir de un desorden o trastorno particular, o que de otro, modo, se encuentre en riesgo de sufrir de un desorden o trastorno particular, en una cantidad la cual sea suficiente como para por lo menos reducir parcialmente el riesgo de desarrollar un desorden o trastorno en cuestión. Tal tipo de cantidad, se define como siendo “una dosis profilácticamente efectiva”. De nuevo, otra vez, las cantidades efectivas para este propósito, dependerán de un gran número de factores específicos del paciente, los cuales se conocen bien, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tales como los consistentes en el estado general del paciente, y en el peso de éste.

40 Para el uso cosmético, las composiciones en concordancia con la presente invención, se administran, a una persona, en una cantidad la cual sea suficiente como para por lo menos reducir parcialmente una imperfección la cual sea tangible, de una apariencia física de una persona. Tal tipo de cantidad, se define como siendo “una dosis cosméticamente efectiva”. De nuevo, otra vez, las cantidades efectivas para este propósito, dependerán de un gran número de factores específicos del paciente, los cuales se conocen bien, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tales como los consistentes en el género de la persona en cuestión, en la raza, en el cutis, en la edad, o en el estado de salud de dicha persona.

45 De una forma general, las composiciones de la presente invención, pueden administrarse en una dosis la cual sea terapéuticamente efectiva, en una dosis la cual sea profilácticamente efectiva, o en una dosis la cual sea cosméticamente efectiva.

50 La composición de la presente invención, puede administrarse a razón de una dosis diaria, correspondiente a una dosis diaria la cual se encuentre comprendida dentro de unos márgenes situados entre los 2 µg y los 20 mg de ácido 4-oxo-2-pentenoico, por kg de peso corporal, siendo dicha dosis diaria a administrar, de una forma preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 20 µg y los 2 mg de ácido 4-oxo-2-pentenoico por kg de peso corporal, tal como, por ejemplo, en una dosis correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 40 µg y 1 mg de ácido 4-oxo-2-pentenoico, por kg de peso corporal.

60 Puede ser ventajoso, el hecho de objetivizar áreas específicas de la piel, en las cuales se deba reducir la pigmentación, tal como, por ejemplo, una peca, o una mancha inherente a la edad, en donde, el objetivo pretendido como finalidad, es del de ajustar o aparejar el color, con el área circundante de la piel. Una aplicación tópica de la composición en concordancia con la presente invención, permite un suministro objetivizado de este tipo. De una forma correspondientemente en concordancia, en la presente invención, la composición en cuestión, puede
65 administrarse tópicamente.

Las composiciones en concordancia con la presente invención, son también susceptibles de poderse administrar oralmente. Esto tiene la ventaja consistente en que, la composición en cuestión, actúa globalmente en la totalidad de la piel, por mediación de una forma de administración, la cual sea rápida y que sea relativamente no restrictiva.

5 Las regiones de la piel, con una pigmentación más oscura, pueden afectar tanto a los animales, como también a los seres humanos. Es por lo tanto una ventaja de la presente invención, el poder proporcionar una composición, a ser administrada a los seres humanos, a los animales domésticos o de compañía, o a los animales de ganadería. Ésta puede también mejorar, así mismo, la satisfacción del dueño de un animal de compañía o doméstico, de que el animal de su propiedad, sea estéticamente atractivo, en cuanto a lo referente al hecho de que las pigmentaciones de la piel, pudieran limitar el éxito de los animales en exhibiciones competitivas, y que pudiera con ello reducirse su valor percibido. La presente invención, proporciona una composición, la cual puede administrarse a los seres humanos, a los animales de compañía o domésticos, o a los animales de ganadería.

15 El ácido 4-oxo-2-pentenoico y la composición la cual se encuentra descrita en la presente invención, pueden administrarse a los adultos y / o una persona mayor.

Un sujeto, se considera como siendo adulto, si éste tiene una edad correspondiente a un rango de edad relativamente maduro. De una forma típica, los sujetos, se consideran como siendo adultos, cuando éstos son sexualmente maduros, y éstos son capaces de reproducción.

20 Un sujeto, se considera como siendo "mayor", se éste ha sobrepasado los dos tercios de la longevidad o vida útil esperada o prevista, y considerada como media, en su país de origen, de una forma preferible, si éstos han sobrepasado los primeros tres cuartas partes de la longevidad o vida útil esperada o prevista, y considerada como media, en su país de origen, de una forma más preferible, si éstos han sobrepasado las primeras cuatro quintas partes de la longevidad o vida útil esperada o prevista, y considerada como media, en su país de origen. Así, por ejemplo, un ser humano, varón, el cual haya nacido en el Reino Unido, en el año 2010, tiene una esperanza de vida de 78 años, en concordancia con la entidad oficial del Reino Unido consistente en la UK Office of National Statistics (Oficina Nacional de Estadística del Reino Unido), y así, por lo tanto, éste se consideraría como siendo "mayor", a una edad la cual se encuentre por encima de los 52 años, de una forma preferible, a una edad la cual se encuentre por encima de los 58 años y 6 meses de edad, y de una forma más preferible, a una edad la cual se encuentre por encima de los 62 años y 5 meses de edad. Para los animales de compañía o domésticos y para los animales de ganadería, deberían tenerse en consideración las especies y las razas o castas a las cuales pertenezcan los animales en cuestión. Así, y a título de ejemplo, un perro de la raza Yorkshire Terrier, tiene una esperanza de vida correspondiente a aprox. 12 años de edad (véase a dicho efecto, E.J. Taylor et al., Proceedings of the Nutrition Society, 54, 645 - 656 (1995)), y así, de este modo éste se considerará como siendo mayor, a una edad la cual se encuentre por encima de los 8 años, de una forma preferible, a una edad la cual se encuentre por encima de los 9 años y, de una forma más preferible, a una edad la cual se encuentre por encima de los 9 años y 7 meses.

40 La aparición de regiones de la piel, con una pigmentación más oscura, tales como las consistentes en las manchas inherentes a la edad (lentigos solares), las machas provocadas por el sol, las manchas cutáneas, y el melasma (al cual también se le conoce como cloasma), se deben, a menudo, a una exposición de una larga duración, a la radiación ultravioleta, procedente de la luz del sol o de las camas solares de los "solariums". Las personas las cuales han vivido durante un prolongado transcurso de tiempo, mas largo, tienen una mayor probabilidad de haber padecido una exposición más prolongada en el tiempo, a la luz ultravioleta. Una composición de la presente invención, puede administrarse, a los adultos, y a los mayores.

50 La naturaleza de la composición en cuestión, no se encuentra limitada. La composición para el uso en la reducción o en prevención de las regiones de la piel con una pigmentación más oscura de la piel, puede seleccionarse a partir del grupo consistente en una composición alimenticia, en una composición farmacéutica, en una aditivo alimenticio, en una composición nutracéutica, en una bebida, en una composición alimenticia para animales domésticos o de compañía, en una materia en polvo, en una crema, en una loción, o en un gel. La composición en concordancia con la presente invención, puede ser en cualesquiera de las formas galénicas normalmente disponibles, para el procedimiento o para la administración que se haya seleccionado. El portador o soporte, puede ser de diversas naturalezas, en dependencia del tipo de composición la cual entre en consideración.

55 La composición para el uso cosmético, puede seleccionarse de entre el grupo consistente en una composición alimenticia, en un aditivo alimenticio, en una bebida, en una composición para animales domésticos o de compañía, en una composición cosmética, en una materia en polvo, en una crema, en una loción, o en un gel.

60 Las composiciones alimenticias de la presente invención, son diversas, en cuanto a lo referente a su carácter, tal como, por ejemplo, las consistentes en: la leche, el yogurt, el queso, las leches fermentadas, los productos fermentados a base de leche, los cremas heladas (helados), los productos a base de cereales o los productos a base de cereales fermentados, las materias en polvo a base de leche, las bebidas frías o estables o susceptibles de poderse conservar en estanterías, los productos los productos de confitería o repostería, los piensos o alimentos para animales, de una forma particular para animales domésticos o de compañía.

La composición alimenticia en cuestión, puede también comprender, de una forma adicional, una fuente de proteínas, una fuente de hidratos de carbono, un fuente de lípidos, una fuente de minerales, y / o una fuente de vitaminas. La presencia de proteínas, de hidratos de carbono, de lípidos, de minerales y / o de vitaminas, puede tener diversas ventajas. Estos compuestos, contribuyen, de una forma general, al sabor y a la textura en boca del producto final, y éstos proporcionan, al cuerpo, unos nutrientes beneficiosos. Éstos permiten así mismo, también, el formular la composición de la presente invención, como una fórmula nutritiva completa, de tal forma que no sea necesaria ninguna nutrición adicional.

Los compuestos solubles en agua, tienen la ventaja de poderse administrar, de una forma conveniente, mediante un gran número de vías o rutas de administración, incluyendo a las soluciones orales, o en cápsulas o tabletas, mediante inhalación, en geles o cremas acuosas para la aplicación tópica, en absorciones mediante inmersión en baños, en geles o champús de ducha, o como gotas para los ojos, como gotas para la nariz, o como para gotas para los oídos. La composición la cual comprende el ácido 4-oxo-2-pentenoico, puede ser una composición de base acuosa, tal como, por ejemplo, una composición la cual puede comprender el ácido 4-oxo-2-pentenoico disuelto en agua.

Otras ventajas y características o rasgos distintivos de la presente invención, resultarán evidentes, a raíz de las figuras y de los ejemplos, los cuales se facilitan abajo, a continuación.

La figura 1, muestra la producción de melanina, mediante melanocitos murinos, previamente tratados con el ácido 4-oxo-2-pentenoico o el ácido kójico, expresada como un porcentaje de la melanina producida mediante el control (un cultivo de melanocitos murinos B16, sin ningún otro compuesto añadido).

La figura 2, muestra la producción de tirosinasa, mediante melanocitos murinos, previamente tratados con el ácido 4-oxo-2-pentenoico o el ácido kójico, expresada como un porcentaje de la tirosinasa, producida mediante el control (un cultivo de melanocitos murinos B16, sin ningún otro compuesto añadido).

La figura 3, muestra un cromatograma típico de un ácido 4-oxo-2-pentenoico estándar disuelto en agua. Una SRM superior, se encuentra asociado con la reacción de transición de m/z 113 \rightarrow 69, mientras que, una SRM inferior, corresponde a la reacción de transición de m/z 113 \rightarrow 41. El tiempo de retención, se expresa en minutos (eje de la x, u ordenada). La intensidad (eje de la y, o abcisa), se expresa en Cps.

La figura 4, muestra la cuantificación del ácido 4-oxo-2-pentenoico, mediante la utilización de HPLC - ESI - MS / MS de las preparaciones de *Bifidobacterium breve* CNCM I - 3865 (OD 40), calentadas durante un transcurso de tiempo de 2, de 15, de 30 y de 60 minutos, a una temperatura de 90 °C (la cual se encuentra indicada mediante círculos, ○), a una temperatura de 120 °C, la cual se encuentra indicada mediante triángulos, Δ), y a una temperatura de 140 °C (la cual se encuentra indicada mediante cuadrados, □).

Ejemplo 1: Efecto del ácido 4-oxo-pentenoico en la pigmentación de la piel

Con objeto de evaluar el efecto del ácido 4-oxo-2-pentenoico sobre la pigmentación de la piel, los inventores, procedieron a utilizar un cultivo de melanocitos murinos (B16), y a llevar a cabo 2 tests de ensayo: la evaluación de la producción de melanina y la evaluación de la producción de tirosinasa.

Condiciones del cultivo celular.

Se procedió a cultivar células B16, en DMEM 1 g / l glucosa, sin rojo fenol, suplementado con un 10 % de suero bovino fetal, en una cámara humidificada, a una temperatura de 37 °C, y con un contenido del 5 % de CO₂. (DNEM, es medio de Eagle modificado por Dulbecco - [de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a Dulbecco's Modified Eagle Medium] -).

Producción de melanina, mediante una línea celular de melanocitos murinos B16.

Se procedió a incubar las células, durante un transcurso de tiempo de 72 horas, con el ácido 4-oxo-2-pentenoico, a una concentración 7 μM ó una referencia de ensayo del ácido kójico (el cual se trata de un conocido inhibidor de la producción de la melanina), a una tasa de 400 μg / ml. Este proceso de incubación, se llevó a cabo en presencia o en ausencia de NDP - MSH, un análogo de la MSH (hormona estimulante de los melanocitos). La cantidad total de melanina (extracelular e intracelular), se evaluó procediendo a medir la densidad óptica, a 405 nm, de cada una de las muestras, contra los patrones estándar de melanina, en presencia o en ausencia de NDP - MSH. La condición de control, corresponde a un cultivo de melanocitos murinos B16, únicamente con el medio, no añadiéndose ningún otro medio.

Producción de tirosinasa mediante la línea celular de melanocitos murinos B16.

Se procedió a incubar las células, durante un transcurso de tiempo de 48 horas, con el ácido 4-oxo-2-pentenoico, a una concentración 7 μM ó una referencia de ensayo del ácido kójico, a una tasa de 400 μg / ml. La producción de

tirosinasa, se evaluó mediante inmunolabeling (inmunomarcaje). La condición de control, corresponde a un cultivo de melanocitos murinos B16, únicamente con el medio, no añadiéndose ningún otro medio.

5 Los resultados obtenidos, se expresaron como un porcentaje relativo al de control. El ácido kójico, inducía, tal y como se esperaba, una reducción en la producción de la melanina, a un porcentaje del 48 %, con respecto al que se había producido en el control, mientras que, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, reducía la producción de melanina, a un valor de cero, véase, a dicho efecto, la figura 1.

10 La producción de tirosinasa, se reducía así mismo, también, mediante ambos, el ácido kójico, y el ácido 4-oxo-2-pentenoico (véase, a dicho efecto, la figura 2), sugiriendo el hecho de que, la reducción en la melanina, era debida, por lo menos en parte, a la inhibición de la tirosinasa. A pesar del hecho de que, el ácido 4-oxo-2-pentenoico era más efectivo que el ácido kójico, en la supresión de la producción de la melanina, éste era no obstante menos efectivo en la supresión de la supresión de la producción de la tirosinasa, los cual indica el hecho de que, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, influye así mismo, también, en los mecanismos los cuales actúan aguas arriba o aguas debajo de esta enzima.

Los datos presentados, nos permiten concluir el hecho consistente en que, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, puede utilizarse en la reducción o en la prevención de las regiones de la piel, con una pigmentación más oscura.

20 Ejemplo 2: Cepas bacterianas, como una fuente del ácido 4-oxo-3-pentenoico

Con objeto de investigar el hecho consistente en si el ácido 4-oxo-2-pentenoico podía obtenerse a partir de microorganismos, se procedió a utilizar tres cepas bacterianas: *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865 (NCC295 0), *Bifidobacterium breve* CNCM I-3914 (NCC466) y *Bifidobacterium breve* ATCC 15700™ (NCC2791). La cepa bacteriana *Bifidobacterium breve* CNCM I-3914, se depositó en la COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM), INSTITUT PASTEUR, (Colección Nacional de cultivos y de microorganismos, Instituto Pasteur), 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS Cedex 15, Francia, en fecha 5 de Febrero del 2008.

30 Para cada cepa, se procedió a inocular 10 ml de agar MRS con un porcentaje del 0,05 % de cisteína, mediante 20 µl de stock de glicerina, y se incubó, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 37 °C, en condiciones anaeróbicas, para formar precultivos. Se procedió, a continuación, a llevar a cabo cultivos adicionales, mediante la inoculación con 10 ml de MRS, con un 0,05 % de cisterna, con los precultivos (OD₆₀₀ final, ajustado a un valor de 0,01). Los cultivos, se incubaron, durante un transcurso de tiempo de 16 horas, a una temperatura de 37 °C, en condiciones anaeróbicas, para formar los cultivos de P2. Se procedió, a continuación, inocular 200 MRS con un porcentaje del 0,05 % de cisterna, mediante los cultivos de P2 OD₆₀₀ final, ajustado a un valor de 0,19, y los frascos, se incubaron, durante un transcurso de tiempo de 16 horas, a una temperatura de 37 °C, en condiciones anaeróbicas.

40 Se procedió, a continuación, a medir el valor de OD₆₀₀, se centrifugaron los cultivos, a una valor de 3300 g, durante un transcurso de tiempo de 10 minuto y, los gránulos bacterianos, se lavaron dos veces, con 1X PBS (solución salina tamponada con fosfato), y se normalizaron al valor de OD₅₀, mediante 1X PBS).

Las fracciones bacterianas, se obtuvieron de dos formas, para cada una de las cepas bacterianas: una "preparación cruda" y una "preparación pura".

45 Las preparaciones bacterianas correspondientes a las "preparaciones crudas", se obtuvieron de la forma la cual se describe a continuación. Se procedió a calentar 5 ml de las preparaciones bacterianas de un valor de OD 50, durante un transcurso de tiempo de 6 horas, a una temperatura de 9 °C, en un bloque de calentamiento (bloque de calentamiento consistente un "Dri-Block DB-3 heating block" de procedencia de la firma Techne, Staffordshire, Reino Unido). La preparaciones bacterianas calentadas, se centrifugaron a 3300 g, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a una temperatura de + 4 °C, y los sobrenadantes, se filtraron, mediante la utilización de filtros de jeringa, de 0,22 µm, y éstos se almacenaron a una temperatura de + 4 °C, hasta proceder a la realización de análisis adicionales.

55 Las preparaciones bacterianas correspondientes a las "preparaciones puras", se obtuvieron de la forma la cual se describe a continuación. Se procedió a centrifugar 5 ml de las preparaciones bacterianas a 3300 g, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a una temperatura de + 4 °C, y los gránulos resultantes, se quebraron, procediendo a su disrupción mediante la utilización de un mini-aparato de batido de perlas (minibatidora), del tipo "bead Beat (MBB) apparatus" en un ambiente frío (seis ciclos de un transcurso de tiempo de 90 segundos, a una velocidad mínima, con un tiempo de pausa de 10 minutos, entre cada uno de los ciclos). Las células disruptas, se centrifugaron, durante un transcurso de tiempo de 1 horas, a 3300 g, a una temperatura de + 4°C, y el gránulo, se volvió s suspender, de nuevo, con 5 ml de 1X PBS, y éste se calentó, durante un transcurso de tiempo de 6 horas, a una temperatura de 90 °C, en un bloque de calentamiento. Las preparaciones calentadas, se centrifugaron, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a 3300 g, a una temperatura de + 14 °C. Los sobrenadantes, se filtraron, mediante la utilización de filtros de jeringa, de 0,22 µm, y éstos se almacenaron a una temperatura de + 4 °C, hasta proceder a la realización de análisis adicionales.

Ejemplo 3: Cuantificación del ácido 4-oxo-2-pentenoico, mediante análisis de HPLC – MS / MS.

Con objeto de cuantificar el ácido 4-oxo-2-pentenoico, se procedió a desarrollar un procedimiento analítico de alto rendimiento, el cual involucraba el acoplamiento de una cromatografía líquida de alto rendimiento, con espectrometría de masas en tándem, mediante ionización por electroproyección (HPLC – ESI – MS / MS).

Se procedió a comprar, en el mercado, el ácido 4-oxo-2-pentenoico estándar, de procedencia de la firma Alfa Aesar (Ward Hill, USA). El agua de grado HPLC, el metanol, y el ácido acético, se compraron, en el mercado, de procedencia de la firma Lichrosolv (Merck, Darmstadt, Alemania). Los viales para los análisis de HPLC, e insertos de 2 mm, se compraron, en el mercado, de procedencia de la firma Agilent (Santa Clara, CA). Se encontró el hecho de que, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, era soluble en agua, a un valor de solución de por lo menos 20 mg / ml. El compuesto estándar del ácido 4-oxo-2-pentenoico, se disolvió, en agua, a un valor final de solución stock, correspondiente a un valor de 10 mg / ml, y posteriormente, se disolvió, de una forma adicional, en agua, con objeto de construir una curva de calibración,

Los análisis de HPLC – ESI – MS / MS, se llevaron a cabo en sistema de cromatografía de flujo turbulento (TFC), (de procedencia de la firma Thermo Fisher, Waltham, MA), acoplado a un espectrómetro de masas, trampa, del tipo “3200 Q TRAP mass spectrometer” (de procedencia de la firma Applied Biosystems). La columna analítica la cual se utilizó, era una columna de análisis del tipo “Hypersil Gold AQ” (3 x 50 mm, 5 mm), adquirida, en el mercado, de procedencia de la firma Thermo Fisher (Waltham, MA), la cual operaba a la temperatura ambiente, a un caudal de flujo constante, correspondiente a un valor de 600 ml / minuto. Las fases móviles, las cuales se utilizaron, se constituyeron mediante el disolvente A), el cual consistía en agua, con un contenido de un 0,05 % de ácido acético, y B), consistente en metanol, con un contenido del 0,05 % de ácido acético. El programa de gradientes, era el siguiente: 0 minutos, 0 % de B, mantenido durante un transcurso de tiempo de 40 segundos (0 – 0,67 minutos) a un 0 % de B, aumentando aun 50 % de B, en un transcurso de tiempo de 180 segundos (0,67 – 3,67 minutos), aumentando desde un 50 % de B, hasta un 90 % de B, en un transcurso de tiempo de 10 segundos (3,67 minutos – 3,83 minutos), manteniendo, durante un transcurso de tiempo de 120 segundos (5,83 minutos), a un 90 % de B, antes de volver a un 0% de B, y manteniendo durante un transcurso de tiempo adicional de 300 segundos (5,83 – 10,83 minutos). El volumen de inyección, era el correspondiente a un valor de 5 µl.

La adquisición de los datos de MS, se realizó según un modo de ionización negativa por electroproyección. El ajuste de la MS, se llevó a cabo mediante la infusión de una solución de ácido 4-oxo-2-pentenoico de calidad estándar (5 µg / ml) en agua), a un caudal de flujo correspondiente a un valor de 10 µl / minuto, mezclada con un flujo de HPLC, del disolvente A y B (en factor de relación o cociente de 80 / 20, referido a volumen : volumen; con un caudal de flujo de 0,6 ml / minuto), mediante la utilización de un conector T. Con objeto de nebulizar y de provocar el efecto cortina con los gases, se procedió a utilizar nitrógeno. Se procedió, a continuación, a activar el calentador de interfaz y, la fuente de temperatura, se mantuvo de nivel de 700 °C, mediante un voltaje de capilaridad ajustado a un valor de – 4,5 kV. Se procedió así mismo, también, a utilizar nitrógeno, como gas de colisión, mediante una selección del valor de la presión, correspondiente a una presión media. La detección de MS / MS, se realizó mediante el modo de adquisición del control de la reacción (SRM). Se procedió a la selección de los dos iones de fragmentos más intensos, mediante la exploración de rastreo de m/z 113 → 69 (con una energía de colisión correspondiente a un valor de 11 eV), y mediante la exploración de rastreo de m/z 113 → 41 (con una energía de colisión correspondiente a un valor de 26 eV), mediante la utilización de unos tiempos de permanencia de 50 ms (con un tiempo total de la exploración de rastreo de 11 ms). El potencial de desagrupamiento, se ajustó a un valor de 29 V. El análisis cuantitativo, se llevó a cabo mediante la utilización de la señal de SRM más intensa, mientras que, segunda transición, se utilizó para la confirmación de los analitos, en base a apropiado factor de relación o cociente de las áreas, calculado a partir de las soluciones estándar. El procesado de datos, se llevó a cabo mediante la utilización de un sistema de software informático, del tipo “Analyst 1.5.1 software (de procedencia de la firma Applied Biosystems).

Detección del ácido 4-oxo-2-pentenoico en PBS y agua, mediante procedimiento de HPLC – MS / MS:

Se procedió a disolver el ácido 4-oxo-2-pentenoico, en 1X PBS ó agua, y se realizó la detección, mediante la utilización de un procedimiento de HPLC – MS / MS, el cual se llevó a cabo de la misma forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba, en la sección anterior. El valor de SRM, asociado con la reacción de transición de m/z 113 → 69, reveló una señal más intensa que la correspondiente a la SRM, asociada con la reacción de transición de m/z 113 → 41, a un tiempo de retención de 1,25 minutos. Se observaron unos tiempos de retención similares, para ambas transiciones, confirmándose con ello la validez de los análisis (véase, a dicho efecto, la figura 3). La molécula del ácido 4-oxo-2-pentenoico, se detectó, de una forma satisfactoria, en ambos, 1X PBS (datos no mostrados en la figura), y agua (véase, a dicho efecto la figura 3).

Establecimiento de la curva estándar para el ácido 4-oxo-2-pentenoico:

Con objeto de cuantificar de una forma precisa la cantidad de ácido 4-oxo-2-pentenoico en las fracciones bacterianas, se procedió a establecer curvas estándar para el ácido 4-oxo-2-pentenoico, en matrices individuales, tales como las consistentes en 1X PBS, o HPLC de grado de agua. Se procedió a suspender el ácido 4-oxo-2-

5 pentenoico, de grado comercial, en 1X PBS y agua, a diferentes dosis. Se procedió, a continuación, a utilizar el procedimiento de HPLC- ESI – MS / MS, para cuantificar las dosis estimadas de ácido 4-oxo-2-pentenoico. Se observó una buena linealidad, entre la cantidad de ácido 4-oxo-2-pentenoico (correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales iban desde los 0,1 µg / ml hasta los 25 µg / ml) y las intensidades resultantes (expresadas en cps), ambas, en 1X PBS y agua del grado HPLC.

Cuantificación del ácido 4-oxo-2-pentenoico en las fracciones bacterianas:

10 Se procedió cuantificar el ácido 4-oxo-2-pentenoico, en las preparaciones bacterianas las cuales se han descrito anteriormente, arriba. Se procedió a diluir la totalidad de las muestras, en agua del grado HPLC (a razón de 3 diluciones / muestra), antes de proceder a la realización del análisis de HPLC – ESI – MS / MS. Los resultados obtenidos, se encuentran resumidos en la Tabla A, la cual se facilita abajo, a continuación.

15 Tabla A: Concentraciones del ácido 4-oxo-2-pentenoico (µg / ml) en preparaciones bacterianas calentadas, crudas, y puras (OD 50), mediante su calentamiento, durante un transcurso de tiempo de 6 horas, a una temperatura correspondiente a un valor de 90 °C.

En la tabla, la expresión N. D., significa el hecho de “no detectable”, bajo el límite de detección del procedimiento.

Cepa	Código de la cepa	Ácido 4-oxo-2-pentenoico (µg / ml) Preparación cruda	Ácido 4-oxo-2-pentenoico (µg / ml) Preparación pura
B. breve	CNCM – I - 3865	95,3	126,8
B. breve	ATCC 15700	2,1	16,4
B. breve	CNCM – I - 3914	N.D.	N.D.

20 Ejemplo 4: Influencia de la temperatura y del tiempo de calentamiento, en la producción del ácido 4-oxo-2-pentenoico, procedente de la cepa de a partir de *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865

25 Con objeto de caracterizar producción del ácido 4-oxo-2-pentenoico procedente de la cepa de *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865, se procedió a llevar a cabo, en el tratamiento por calor, un experimento cinético, mediante la utilización de varias temperaturas. Para la realización de este experimento, se procedió a utilizar el “stock maestro” de biomasa, el cual se produjo en biorreactores, a una temperatura de de 37 °C, con medio MRS, mediante condiciones anaeróbicas, y mediante el control del valor pH. Después del crecimiento del cultivo (durante un transcurso de tiempo de 16 horas⁹, se procedió a retirar el medio de cultivo y, las células, se lavaron, dos veces, mediante 1X PBS, éstas de concentraron hasta un valor OD 134 (1,5 E – 10 ufc / ml, en 1X PBS, con un 10 % glicerol, y a continuación, éstas se almacenaron, a una temperatura de -80 °C, en alícuotos de 50 ml.

30 Se procedió, a continuación, a preparar una “biomasa de trabajo” de la bacteria de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865, a partir del estock maestro, de la forma la cual se describe a continuación: se procedió a lavar la biomasa, dos veces, mediante 1X PBS, y se ajustó a un valor de OD 40, en 1X PBS, el cual corresponde a 1, y 0,5 E 10 ufc / ml, respectivamente.

35 Se procedió a la utilización de un Aparato de Calentamiento de Temperatura (THA), para investigar el efecto de diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento. Este sistema, se trata de una versión, a pequeña escala, de aparatos típicos, los cuales se encuentran en entonos de producción. Se utiliza vapor, para calentar un tubo de retención, el cual contiene cartuchos de biomasa. Se procedió a aplicar una temperaturas en las muestras, correspondientes a unos valores de 90 °C, de 120 °C, y de 140 °C, durante unos transcurros de tiempo de hasta 60 minutos. Se procedió, a continuación, a tratar mediante calor, 5 ml de cada una de las biomazas tratadas mediante calor, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a 5000 b, y los sobrenadantes, se filtraron (0,2 µm), y el contenido de ácido 4-oxo-2-pentenoico, se cuantificó mediante procedimiento de HPLC – ESI – MS / MS. Las cantidades de ácido 4-oxo-2-pentenoico, las cuales se generaron, se muestran en la figura 4.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Composición, la cual comprende ácido 4-oxo-2-pentenoico, para su uso en la producción o en la prevención de regiones de la piel con una pigmentación más oscura, resultante de unas condiciones patológicas, seleccionadas de entre el grupo consistente en el piebaldismo, en el vitíligo, en la lesión o inflamación relacionada con las condiciones de la piel, en la enfermedad de Addison, en la enfermedad de Cushing, en la acantosis nigricans, y en la enfermedad tiroidea.
- 10 2.- Composición para su uso según la reivindicación 1, en donde, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, es obtenible a partir de *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865 ó *Bifidobacterium breve* ATCC 15700.
- 15 3.- Composición, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la cual comprende al ácido 4-oxo-2-pentenoico, en una cantidad de por lo menos un 1 mg por kg de composición, de una forma preferible, en una cantidad de por lo menos 10 mg por kg de composición, tal como, por ejemplo, en una cantidad comprendida entre 50 mg por kg y 50 g por kg de la composición.
- 20 4.- Composición, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, a ser administrada en una dosis diaria correspondiente a un valor comprendido entre 2 µg y 20 mg de ácido 4-oxo-2-pentenoico, por kg de peso corporal, de una forma preferible, en una dosis diaria correspondiente a un valor comprendido entre 20 µg y 2 mg de ácido 4-oxo-2-pentenoico, por kg de peso corporal, tal como, por ejemplo, entre 40 µg y 1 mg de ácido 4-oxo-2-pentenoico, por kg de peso corporal.
- 25 5.- Composición, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la composición, se selecciona de entre el grupo consistente en una composición alimenticia, una composición farmacéutica, un aditivo alimenticio, una composición nutracéutica, una bebida, una composición para animales de compañía, una materia en polvo, una crema, una loción, o un gel.
- 30 6.- Uso cosmético de una composición, la cual comprende 4-oxo-2-pentenoico para la reducción o la prevención de regiones de la piel con una pigmentación más oscura.
- 35 7.- Uso, según la reivindicación 6, para el aclarado de la piel.
- 8.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en donde, las regiones de la piel con una pigmentación más oscura, se seleccionan de entre el grupo consistente en los lunares, en las marcas de nacimiento, en el melasma, en las pecas, en las manchas inherentes a la edad, o combinaciones de entre éstos.
- 40 9.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, es obtenible a partir de fuentes naturales.
- 45 10.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde, el ácido 4-oxo-2-pentenoico, es obtenible a partir de *Bifidobacterium breve* CNCM I-3865 ó de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700.
- 50 11.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde, la composición, comprende ácido 4-oxo-2-pentenoico, en una cantidad de por lo menos un 1 mg por kg de composición, de una forma preferible, en una cantidad de por lo menos 10 mg por kg de composición, tal como, por ejemplo, en una cantidad comprendida entre 50 mg por kg y 50 g por kg de la composición.
- 55 12.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde, la composición, debe administrarse en una dosis diaria correspondiente a un valor comprendido entre 2 µg y 20 mg de ácido 4-oxo-2-pentenoico, por kg de peso corporal, de una forma preferible, en una dosis diaria correspondiente a un valor comprendido entre 20 µg y 2 mg de ácido 4-oxo-2-pentenoico, por kg de peso corporal, tal como, por ejemplo, entre 40 µg y 1 mg de ácido 4-oxo-2-pentenoico, por kg de peso corporal.
- 60 13.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en donde, la composición, es para ser administrada tópicamente.
- 14.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en donde, la composición, es para ser administrada oralmente.
- 15.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en donde, la composición, se selecciona de entre el grupo consistente en una composición alimenticia, una composición farmacéutica, un aditivo alimenticio, una composición nutracéutica, una bebida, una composición para animales de compañía, una materia en polvo, una crema, una loción, o un gel.

Fig. 1

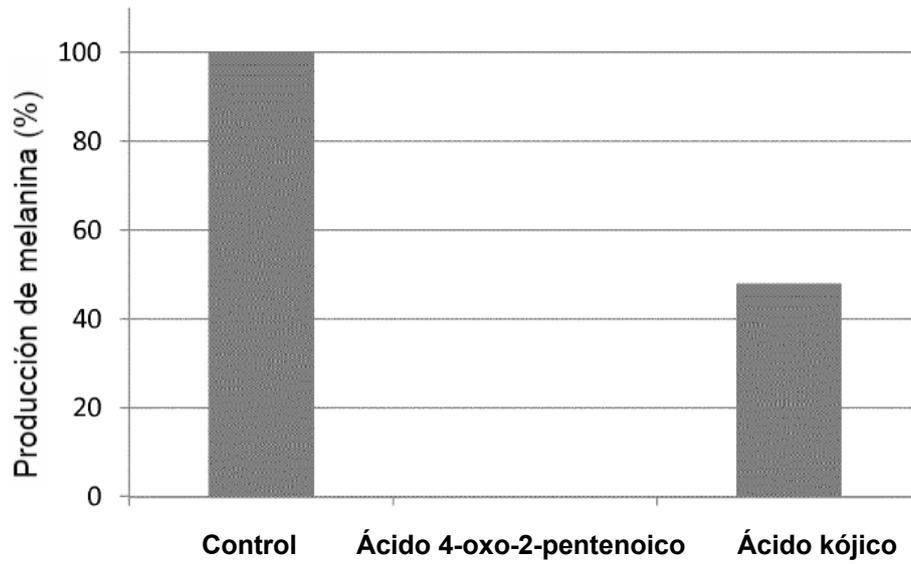


Fig. 2

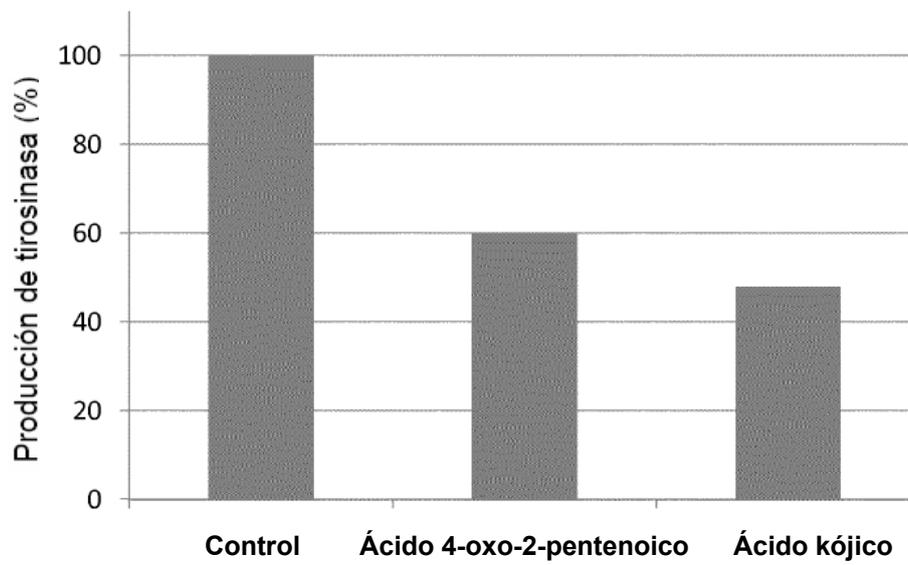


Fig. 3

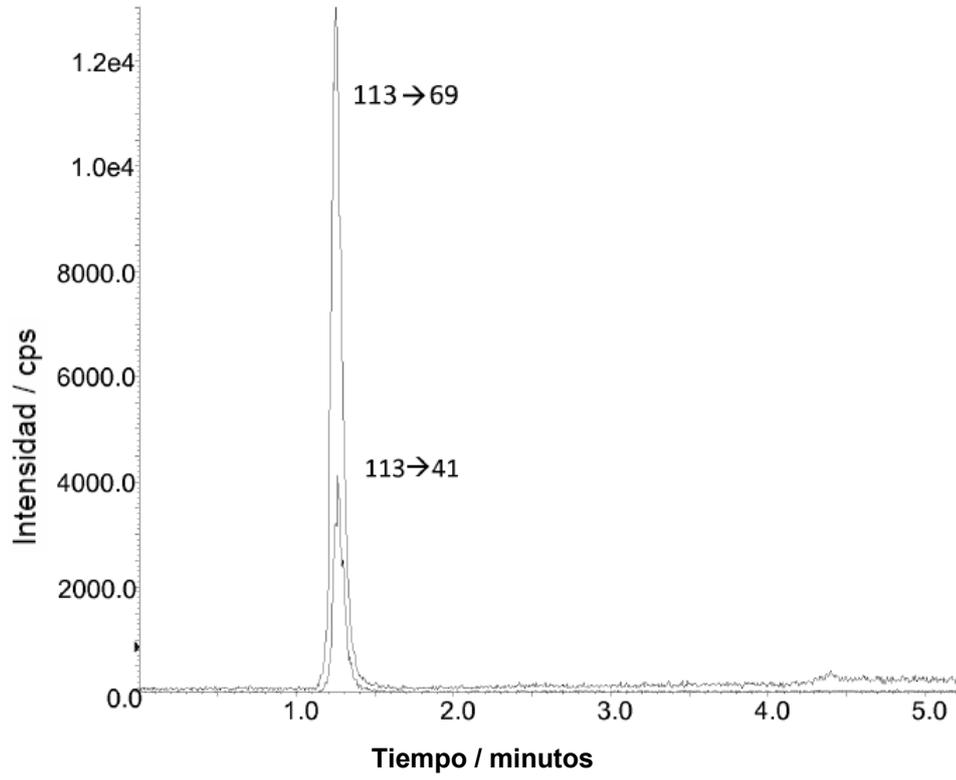


Fig. 4

