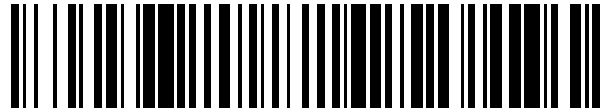


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 024**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61K 9/10** (2006.01)

**A61K 36/00** (2006.01)

**A61K 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2013 PCT/EP2013/073565**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14076055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2013 E 13791976 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2919757**

54 Título: **Un método para la preparación de composiciones botánicas bioactivas y las composiciones hechas a partir de dicho método utilizando un campo electromagnético de más de 3 GHz**

30 Prioridad:

**14.11.2012 US 201261726195 P**  
**22.02.2013 EP 13156315**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.03.2017**

73 Titular/es:

**ISP INVESTMENTS INC. (100.0%)**  
**1011 Centre Road**  
**Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

**KOGANOV, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 606 024 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

Un método para la preparación de composiciones botánicas bioactivas y las composiciones hechas a partir de dicho método utilizando un campo electromagnético de más de 3 GHz

5

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de fracciones botánicas y a las composiciones preparadas a partir de dichas fracciones.

10

### Antecedentes de la invención

Durante las últimas décadas, las industrias farmacéutica, cosmética y de cuidado personal han adoptado el uso de plantas y productos vegetales en una diversidad de formulaciones y productos beneficiosos. Aunque se espera que esta tendencia continúe en el largo plazo, existe una continua necesidad de ingredientes botánicos de mayor calidad que tengan una pureza y actividad mejoradas que tengan menos efectos negativos y que estén libres de solventes, y que se preparen mediante métodos sostenibles y respetuosos con el medio ambiente.

15

La industria en su conjunto ha incrementado su apoyo a los esfuerzos para desarrollar y comercializar formulaciones "naturales" utilizando una multitud de ingredientes botánicos individuales y mezclados que se encuentran actualmente disponibles para la industria. Con el objeto de asegurar la calidad, seguridad y consistencia, la industria cosmética, por ejemplo, ha desarrollado e implementado diversos procedimientos operativos estándar y controles estrictos de especificación para todas las materias primas entrantes para su utilización en formulaciones cosméticas. Muchos de los extractos botánicos actuales no logran cumplir con los crecientes controles y parámetros de uniformidad de la industria cosmética. Los métodos actuales de extracción de plantas limitan los parámetros de especificación de producto, dejando mucho margen a la variabilidad de calidad, rendimiento y compatibilidad. Además, los métodos actuales de extracción no logran entregar el espectro completo de actividades que existen dentro de las células vegetales. Por lo tanto, el potencial de las formulaciones cosméticas basadas en la botánica no se ve plenamente realizado debido a que los métodos de extracción de ingredientes cosméticos botánicos bioactivos no son adecuados.

20

25

30

Muchos de los métodos actuales para extraer componentes bioactivos a partir de plantas implican técnicas que son dañinas para el tejido vegetal o para los componentes bioactivos de interés contenidos en dicho tejido, o para ambos. Adicionalmente, muchos de los métodos actuales de extracción y separación producen extractos botánicos crudos que contienen contaminantes biológicos o químicos que pueden provocar una pérdida de potencia de la bioactividad, aumentos de la citotoxicidad y disminuciones de la vida útil. Adicionalmente, los métodos de extracción actuales a menudo requieren la utilización de disolventes químicos agresivos para producir un extracto botánico más refinado. Por consiguiente, es necesario un método para la preparación de composiciones botánicas bioactivas a partir de plantas, que preserve la integridad de los componentes bioactivos y produzca resultados consistentes de lote a lote. Adicionalmente, en la industria cosmética se necesitan composiciones botánicas bioactivas que sean capaces de cumplir con los estándares industriales con respecto a vida útil, citotoxicidad, calidad y rendimiento.

35

40

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de fracciones botánicas a partir de biomasa vegetal fresca, de acuerdo con la reivindicación 1 y a composiciones preparadas a partir de dichas fracciones, de acuerdo con la reivindicación 14 o 15. El proceso comprende moler (o macerar) y prensar biomasa vegetal fresca con el objeto de obtener un material vegetal intracelular (o jugo celular vegetal) que contenga fracciones de membranas (que contengan núcleos o cloroplastos, o cromoplastos, o mitocondrias o combinaciones de los mismos), y tratar dicho jugo celular con ondas electromagnéticas con una frecuencia eficaz para desencadenar la separación de dicha fracción de membranas de dicho jugo celular con el objeto de producir una fracción de citoplasma/citosol celular (todos los componentes residuales del jugo celular) sustancialmente libre de fracciones de membranas. El tratamiento mencionado anteriormente se realiza de forma que la temperatura de dicho jugo celular no exceda los 40 °C durante dicho tratamiento.

45

50

55

La presente invención también se refiere a fracciones botánicas obtenidas ya sea de la fracción de membranas o de la fracción de citoplasma/citosol de plantas frescas. La presente invención se refiere adicionalmente a procesos para producir las composiciones cosméticas botánicas, así como a métodos para utilizar las composiciones.

60

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un dibujo esquemático que muestra una realización del proceso para preparar las composiciones cosméticas botánicas bioactivas de la presente invención.

65

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de fracciones botánicas a partir de biomasa vegetal fresca de acuerdo con la reivindicación 1 y a composiciones preparadas a partir de dichas fracciones de acuerdo con la reivindicación 14 o 15. El proceso comprende moler (o macerar) y prensar biomasa vegetal fresca con el objeto de obtener un material vegetal intracelular, denominado en el presente documento como jugo celular vegetal, que contenga fracciones de membranas y tratar dicho jugo celular con ondas electromagnéticas con una frecuencia eficaz para desencadenar la separación de dicha fracción de membranas de dicha fracción de jugo celular con el objeto de producir una fracción de citoplasma/citosol celular sustancialmente libre de fracciones de membranas. El tratamiento anteriormente mencionado realiza de forma que la temperatura de dicho jugo celular no exceda de 40 °C durante dicho tratamiento.

La fracción de membranas puede luego utilizarse con el objeto de proporcionar una composición cosmética botánica estable que presente actividad antiproteolítica, inhibidora del crecimiento celular y/o tanto actividad antiproteolítica como actividad inhibidora de crecimiento, en donde la actividad antiproteolítica se debe a la inhibición de al menos una proteinasa y la actividad inhibidora del crecimiento celular se debe a la inhibición del crecimiento celular de al menos un tipo de célula.

La fracción de citoplasma/citosol puede utilizarse con el objeto de proporcionar una composición botánica adecuada para su utilización como un componente en una formulación farmacéutica, cosmética, nutricional, terapéutica y/o de cuidado personal y similares.

**Proceso global para la preparación de fracciones botánicas de la invención**

A modo de ejemplo, el proceso global para la preparación de las composiciones cosméticas botánicas bioactivas de la presente invención se describe a continuación con referencia a la Fig. 1. Como se ilustra en la Fig. 1, las plantas frescas se cosechan, recolectan y lavan para producir biomasa vegetal fresca 2. Esta biomasa vegetal fresca se somete a molienda, maceración y prensado 4 para producir material vegetal intracelular (jugo celular) 6 y material enriquecido en fibras (torta prensada) 8. Después se filtra el jugo celular 6 a través de una malla de nailon 10 para producir jugo celular vegetal filtrado 12. Se expone el jugo celular filtrado 12 a tratamiento por ondas electromagnéticas 14 con una frecuencia que desencadene su desestabilización. Después se somete el jugo celular desestabilizado a centrifugación 18 con el objeto de producir la fracción de membranas precipitada 20 y un sobrenadante que es la fracción de citoplasma/citosol 30. La fracción de membranas 20 es una composición cosmética botánica bioactiva que puede añadirse a productos cosméticos tal como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 7.442.391; 8.101.212; 8.277.852 y 8.318.220. La fracción de citoplasma/citosol 30 vegetal se utiliza para procesos adicionales, tal como se describe más adelante.

La fracción de citoplasma/citosol 30 puede de forma opcional someterse a tratamientos adicionales: *i*, *ii*, *iii* o *iv* tal como se resume más adelante. Como ejemplo no limitativo, el tratamiento (*i*) puede incluir precipitación isoelectrónica 32 y después la centrifugación 34 que permite la separación de la fracción de citoplasma precipitado 36 del sobrenadante que contiene la fracción de citosol 38, como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 7.442.391; 8.101.212 y 8.277.852. Como alternativa, la fracción de citosol/citoplasma puede separarse adicionalmente como resultado de (*ii*) tratamiento electromagnético adicional (a una frecuencia > 7 GHz), seguido de centrifugación o filtración, o (*iii*) filtración de membrana, o (*iv*) ultrafiltración, o una combinación de los mismos (*i*, *ii*, *iii*, *iv*). Los componentes de la fracción de citoplasma/citosol pueden utilizarse "como están" o pueden separarse adicionalmente y utilizarse. También pueden estabilizarse con conservantes y antioxidantes, como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 7.442.391; 7.473.435; 7.537.791; 8.043.635; 8.101.212; 8.277.852 y 8.318.220.

**Proceso para la preparación de las composiciones cosméticas derivadas de membranas**

En una realización, el proceso para la preparación de las composiciones cosméticas obtenidas de membranas es como sigue. Este método implica proporcionar jugo celular vegetal que se ha separado de una biomasa vegetal fresca. "Biomasa vegetal fresca", tal como se utiliza a lo largo de toda de esta solicitud, está destinado a dar a entender que la mayor parte de la biomasa vegetal cosechada de forma reciente se encuentra en estado vivo y/o no ha experimentado una cantidad significativa de degradación no deseada. Después, el jugo celular vegetal se trata en condiciones eficaces para desencadenar la separación en una fracción de membranas y en un sobrenadante de jugo celular. La fracción de membranas resultante posee actividad antiproteolítica, actividad inhibidora del crecimiento celular o tanto actividad antiproteolítica como actividad inhibidora del crecimiento celular. Después, la fracción de membranas se convierte en condiciones eficaces para producir una composición cosmética botánica bioactiva estable que presente modulación de la actividad inhibidora proteolítica, del crecimiento celular, o ambas actividades de inhibición proteolítica y del crecimiento celular, en donde la actividad proteolítica se debe a la modulación de al menos una proteinasa y la actividad de modulación del crecimiento celular se debe a la modulación del crecimiento celular de al menos un tipo de célula.

65

El jugo celular vegetal puede separarse a partir de todo de tipo de plantas. Los ejemplos de plantas adecuadas que pueden utilizarse como fuentes de biomasa vegetal fresca en el presente documento incluyen, sin limitación, plantas de las siguientes familias: *Laminariaceae*, *Cladophoraceae*, *Fabaceae*, *Theaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Poaceae*, *Moraceae*, *Apiaceae*, *Portulacaceae*, *Rutaceae* y *Rosaceae*. En particular, los ejemplos de plantas específicas que se han probado y encontrado como apropiadas como fuentes de biomasa vegetal fresca incluyen algas laminariales (*Macrocystis pyrifera*), algas verdes (*Chaetomorpha*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), soja (*Glycine max*), planta de té (*Camellia sinensis*), caléndula (*Calendula officinalis*), matricaria (*Tanacetum parthenium*), manzanilla alemana (*Chamomilla recutita*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), salvia (*Salvia officinalis*), loto (*Nelumbo nucifera*), lirio (*Lilium bulbiferum*), avena (*Avena sativa*) y cebada (*Hordeum vulgare*), especies de ficus (*Ficus benghalensis*, *Ficus carica*, *Ficus microcarpa*), manzana (*Pyrus malus*), diente de león (*Taraxacum officinales*), limón (*Citrus limon*), verdolaga (*Portulaca oleracea*), perejil (*Petroselinum crispum*). Pueden utilizarse diversas partes de las plantas. Por ejemplo, para muchos tipos de plantas puede utilizarse el tejido de los tallos y de las hojas. Para otras plantas, se pueden utilizar las flores como fuente de jugo celular vegetal para su utilización en la presente invención. Por ejemplo, una realización de la presente invención utiliza, para la separación del jugo celular vegetal, tejido de flores de caléndula. En otra realización, se utilizan las hojas y tallos de la salvia.

El jugo celular vegetal puede separarse utilizando diversas técnicas de separación. Sin embargo, la técnica de separación da como resultado jugo celular vegetal que conserva los componentes bioactivos de la planta.

Un método ejemplar de preparación de biomasa vegetal para su utilización en la extracción de jugo celular vegetal implica cosechar, recolectar y lavar las plantas frescas. Las etapas apropiadas a seguir para preparar la biomasa vegetal fresca incluyen, por ejemplo, los siguientes: (1) conservación de contenido de humedad intrínseco a las células vegetales; (2) optimización de la altura de corte utilizada durante la cosecha de tejidos vegetales por encima del nivel del suelo; (3) resguardo de la integridad de la planta durante la cosecha (por ejemplo, durante el corte de tejido vegetal por encima del nivel del suelo); (4) minimización del impacto ambiental y del factor tiempo de la degradación biológica de la biomasa vegetal y (5) limpieza de la biomasa vegetal antes del procesamiento (por ejemplo, antes de la molienda y maceración). Cada uno de estas etapas se discute más adelante.

#### Conservación del contenido de humedad intrínseco:

El corte debería efectuarse para evitar el marchitamiento debido a la pérdida de humedad. Las condiciones óptimas son aquéllas en donde se mantiene y conserva el contenido de humedad natural.

#### Altura de corte óptima y preferente:

Las plantas deberían cortarse al menos varios centímetros por encima del nivel del suelo, para limitar la cantidad de tierra y de otros residuos en la biomasa recolectada. Por ejemplo, toda biomasa utilizable de hojas y tallos de cualquier fuente vegetal dada puede cortarse a una altura mayor o igual a 5 centímetros por encima del nivel del suelo. Si se utiliza tejido de flores como fuente de biomasa vegetal, las flores se separan de la planta entera antes de la extracción del jugo celular vegetal.

#### Conservación de la integridad de la planta durante la cosecha:

La cosecha de biomasa vegetal puede ser mediante el corte del tejido de tallos y hojas de la planta por sobre el nivel del suelo. El corte se realiza de manera que se evite o minimice el troceado, machacado, aplastamiento u otro tipo de daño de la planta. Para la cosecha industrial a gran escala, en donde puede no ser posible evitar el troceado debido al tipo de equipo requerido, se tiene cuidado de minimizar los daños que podrían conducir a procesos de crecimiento microbiano, pérdida de humedad, intensificación de la oxidación, polimerización, isomerización e hidrólisis (es decir, procesos catabólicos indeseados) en las plantas recolectadas. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, se cortan y recolectan plantas de forma manual como plantas enteras. En otra realización, los tejidos vegetales se cortan utilizando equipos de cosecha. En ese caso, la altura mínima de troceado por encima del suelo para cada planta es mayor o igual a 5 centímetros. Adicionalmente, se presta particular atención para minimizar los daños durante y luego del corte. En otra realización, se recolectan plantas en floración enteras de forma manual y las flores se separan después para su procesamiento adicional.

#### Minimización del impacto ambiental y del factor tiempo de degradación:

El tiempo de entrega del material vegetal cortado a las instalaciones de procesamiento y la exposición de la biomasa al sol, temperaturas elevadas y otros factores ambientales negativos deberían minimizarse para evitar el impacto de procesos de degradación indeseados como se describen anteriormente. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, el tiempo de entrega de plantas *Fabaceae* para su adicional procesamiento no excede de los 30 minutos desde el momento de corte. En otra realización, las plantas sometidas al transporte de grandes distancias se tratan en un procedimiento posterior al corte que implica colocar inmediatamente la biomasa vegetal en enfriadores de espuma de poliestireno extruido que contengan bolsas de paquetes de gel congelado para ayudar a mantener la frescura y el contenido de humedad natural durante la distribución durante la noche hasta las instalaciones de procesamiento. Estos procedimientos se llevaron a cabo para biomasa vegetal procedente de las

familias *Lamiaceae* y *Moraceae*. También pueden utilizarse otros procedimientos posteriores al corte que logren los resultados antes descritos. Como ejemplo no limitativo, para muchas especies vegetales es beneficioso no solo minimizar el tiempo de distribución para el procesamiento, sino también mantener frío el material vegetal cortado, mediante refrigeración si es necesario, para impedir y/o minimizar una degradación indeseada antes de y/o durante el procesamiento.

#### Etapa de limpieza previa a la molienda y la maceración:

Una vez que el tejido vegetal se ha cosechado, se realiza una etapa de lavado para eliminar las partículas del suelo y otros residuos de las plantas antes del procesamiento adicional. El lavado se consigue utilizando un enjuague a baja presión de corta duración en condiciones que impidan el inicio de liberación de jugo celular de la biomasa, que impidan daños o que impidan la eliminación de componentes valiosos. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, el lavado de la biomasa vegetal se logró en menos de, o en un tiempo igual a, 5 minutos con una presión de agua menor o igual a  $1 \text{ kg/cm}^2$ . El agua residual del lavado no contenía ningún pigmento verde o amarillo, lo cual indica la ausencia de daños posteriores. El exceso de agua se elimina de la biomasa lavada con el objeto de mantener el contenido de materia seca cercano a su nivel natural.

Luego de que la biomasa de tejido vegetal se ha cosechado, como se describe anteriormente, se realiza un procesamiento adicional de la biomasa de tejido vegetal para producir el jugo celular vegetal. En una realización, la biomasa de tejido vegetal cosechada se somete a molienda, maceración y prensado para separar el contenido intracelular, es decir, el jugo celular, y para separarlo de la torta prensada enriquecida en fibras que contiene, predominantemente, paredes celulares.

Un ejemplo de protocolo de procesamiento adecuado implica las etapas que se describen más adelante. Puede utilizarse un molino de martillos para moler las plantas, para producir partículas de tejido vegetal de un tamaño pequeño en un tiempo reducido y sin un aumento significativo de la temperatura de la biomasa. En una realización, se utiliza un molino de martillos modificado para producir un tamaño máximo de partículas vegetales maceradas menor de o igual a 0,5 centímetros durante menos de, o en un tiempo igual a, 10 segundos de tratamiento, en donde el aumento de temperatura de la biomasa es menor de o igual a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Se minimiza la exposición de la biomasa vegetal molida y macerada para impedir el impacto de procesos catabólicos indeseados, como se describe anteriormente. Se da comienzo a la separación del jugo celular vegetal del material enriquecido en fibras (o torta prensada) tan pronto como sea posible tras la molienda y maceración de la biomasa vegetal. La biomasa vegetal se procesa en un período corto de tiempo y sin un aumento significativo de temperatura. En una realización, inmediatamente después de la molienda y maceración, la biomasa vegetal se prensa utilizando una prensa de tornillo horizontal continua (prensa compacta "CP-6", Vincent Corporation, FL). Se mantiene la presión sobre el cono a un nivel de  $24 \text{ kg/cm}^2$ , la velocidad de tornillo es de 12 rpm y el aumento de la temperatura de la biomasa es menor de o igual a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . El jugo celular inicial habitualmente contiene pequeñas partículas de fibra, que pueden absorber componentes valiosos del jugo celular y también bloquear las mangueras y bombas. Las partículas anteriores deben eliminarse por filtración o por centrifugación a baja velocidad. Por ejemplo, los jugos celulares iniciales producidos tras la etapa de prensado se filtran a través de cuatro capas de tejido de nylon antes de utilizar el jugo celular vegetal en los métodos de la presente invención.

Una vez que se ha separado el jugo celular vegetal, el jugo celular vegetal es una dispersión coloidal relativamente estable en la cual los orgánulos representan la fase dispersa y el citoplasma representa la fase continua. Después, el jugo celular se trata mediante procesos que implican (1) desencadenar la desestabilización de la dispersión coloidal anterior realizando un "inicio de la etapa de agregación de la fracción de membranas" para producir un jugo celular desestabilizado y (2) realizar una "etapa de separación de la fracción de membranas" en la mezcla desestabilizada de jugo celular para producir una fracción de membranas (que contiene núcleos, o cloroplastos, o cromoplastos, o mitocondrias, o combinaciones de los mismos) y un sobrenadante de jugo celular. En una realización, el inicio de la desestabilización de la fracción de membranas se logra sometiendo a dicho jugo celular a ondas electromagnéticas a una frecuencia mayor de 3 GHz. Después de lograr la desestabilización, se realiza una etapa de separación de la fracción de membranas. Esta etapa incluye, por ejemplo, la separación del jugo celular desestabilizado en la fracción de membranas y el sobrenadante de jugo celular, utilizando técnicas de separación que incluyen filtración, o centrifugación, o una combinación de las mismas.

En el proceso de la invención se puede emplear una diversidad de instrumentos con el objeto de generar las ondas electromagnéticas necesarias para desestabilizar el jugo celular: magnetrones, conductos de la red eléctrica, klistrones, klistrodos, amplificadores de campo cruzado, tubos de onda progresiva y girotrones. Un instrumento como estos incluye, pero sin limitación, un magnetrón de alta potencia. Los magnetrones convencionales e industriales operan a una frecuencia de 915 MHz y 2,45 GHz. Sin embargo, a esas frecuencias se genera un calor indeseable que puede desnaturar la composición de jugos celulares. En el proceso de la presente invención, las ondas electromagnéticas operan a frecuencias que son sustancialmente más elevadas que las frecuencias de los magnetrones convencionales o industriales, lo cual permite la desestabilización del jugo celular sin una desnaturación indeseada debida a la generación de calor. La frecuencia de dichas ondas electromagnéticas en la etapa de desestabilización de la presente invención está por encima de la frecuencia de los magnetrones de

microondas convencionales, es decir, por encima de 3 GHz, en otra realización mayor de 3 GHz y menos de aproximadamente 7 GHz y en otra realización desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6 GHz. Durante la etapa de desestabilización de la invención, la temperatura del jugo celular se mantiene por debajo de 40 °C, en otra realización por debajo de aproximadamente 35 °C, en otra realización por debajo de aproximadamente 30 °C, en otra realización por debajo de aproximadamente 25 °C, en otra realización por debajo de aproximadamente 20 °C.

La fracción de membranas recién obtenida, comúnmente denominada en la técnica como “concentrado proteico-vitamínico”, es una pasta que tiene un color intenso y un olor específico que son específicos de la fuente de materia prima vegetal. La fracción de membranas está representada de forma predominante por cloroplastos en las partes verdes de la planta o de forma mayoritaria por cromoplastos presentes en las flores. La composición de la fracción de membranas incluye predominantemente fosfolípidos, proteínas de membrana, clorofila, núcleos, mitocondrias y carotenoides.

#### Proceso para preparar composiciones cosméticas obtenidas de la fracción de citoplasma/citosol sustancialmente libres de fracciones de membranas

La presente invención también se refiere a un método para preparar composiciones cosméticas obtenidas de la fracción de citoplasma/citosol sustancialmente libres de fracciones de membranas que presentan actividad antioxidante, actividad de estimulación del crecimiento celular o tanto actividad antioxidante como actividad de estimulación del crecimiento celular. El método implica proporcionar un jugo celular que se ha separado de una biomasa vegetal fresca, como ya se ha descrito anteriormente con respecto a la Composición Cosmética Obtenida de Membrana. Después, el jugo celular vegetal se trata en condiciones eficaces para separar el jugo celular vegetal en una fracción de membranas y una fracción de citoplasma/citosol.

Después, la fracción de citoplasma/citosol puede procesarse opcional y adicionalmente en condiciones eficaces para separar la fracción de citoplasma/citosol en sus partes componentes, es decir la fracción de citoplasma y una fracción de citosol. La fracción de citoplasma incluye de forma predominante proteínas solubles blancas; en plantas C3, estas proteínas consisten en gran medida en la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa. La fracción de citosol contiene componentes solubles de bajo peso molecular. La fracción de citosol se refina en condiciones eficaces para producir una fracción de suero celular que tiene actividad antioxidante, actividad de estimulación del crecimiento celular o tanto actividad antioxidante como actividad de estimulación del crecimiento celular. La fracción de suero celular se estabiliza en condiciones eficaces para producir una composición cosmética botánica bioactiva estable que presenta actividad antioxidante, actividad de estimulación del crecimiento celular o tanto actividad antioxidante como actividad de estimulación del crecimiento celular, como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 7.442.391; 7.473.435; 7.537.791; 8.043.635; 8.101.212; 8.277.852 y 8.318.220.

El jugo celular vegetal puede obtenerse a partir de todo tipo de plantas. Los ejemplos de plantas adecuadas que pueden utilizarse como fuentes de biomasa vegetal fresca en el presente documento incluyen, pero sin limitación, plantas de las siguientes familias: *Laminariaceae*, *Cladophoraceae*, *Fabeaceae*, *Theaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Poaceae*, *Moraceae*, *Apiaceae*, *Portulacaceae*, *Rutaceae* y *Rosaceae*. En particular, los ejemplos de plantas específicas que se han analizado y encontrado como adecuadas como fuente de biomasa vegetal fresca incluyen algas laminariales (*Macrocystis pyrifera*), algas verdes (*Chaetomorpha*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), soya (*Glycine max*), planta de té (*Camellia sinensis*), caléndula (*Calendula officinalis*), matricaria (*Tanacetum parthenium*), manzanilla alemana (*Chamomilla recutita*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), salvia (*Salvia officinalis*), loto (*Nelumbo nucifera*), lirio (*Lilium bulbiferum*), avena (*Avena sativa*) y cebada (*Hordeum vulgare*), especies de ficus (*Ficus benghalensis*, *Ficus carica*, *Ficus microcarpa*), manzana (*Pyrus malus*), diente de león (*Taraxacum officinales*), limón (*Citrus limon*), verdolaga (*Portulaca oleracea*), perejil (*Petroselinum crispum*). Pueden utilizarse diversas partes de las plantas. Por ejemplo, en muchos tipos de plantas puede utilizarse el tejido de los tallos y de las hojas. Para otras plantas, se pueden utilizar las flores como fuente de jugo celular vegetal para su utilización en la presente invención. Por ejemplo, una realización de la presente invención utiliza tejido de flores de caléndula para la separación del jugo celular vegetal. En otra realización, se utilizan tejido de las hojas y tallos de la salvia. Como se describe anteriormente, una vez que se ha separado el jugo celular vegetal en la fracción de membranas y en un sobrenadante de jugo celular, es decir la fracción de citoplasma/citosol 30 que se somete a los tratamientos adicionales: *i*, *ii*, *iii* o *iv* (Fig.1), que permiten separar la fracción de citoplasma de la fracción de citosol.

Los criterios cuantitativos para evaluar la separación completa de la fracción de citoplasma es la ausencia de niveles detectables de proteínas de alto peso molecular y/o la ausencia de ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa en la fracción de citosol.

La fracción de citosol es un líquido claro que tiene un ligero color amarillo y un ligero olor característico. En varias horas, la fracción de citosol inestable se transforma de forma irreversible en una suspensión de color marrón oscuro que contiene un precipitado pesado y un olor fuerte no característico. Como resultado, la fracción de citosol no puede utilizarse como ingrediente cosmético. El procedimiento que se describe a continuación permite el refinamiento de la fracción de citosol para producir una fracción de suero estable y activo que es un ingrediente cosmético estable. Esto se logra eliminando de la fracción de citosol los principales componentes responsables de las transformaciones irreversibles que conducen a la generación de precipitados y al deterioro del color y del olor

indeseados. Este procedimiento incluye: ajuste del pH, tratamiento por calor, enfriamiento, filtración por vacío y estabilización, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N.º 7.442.391; 8.101.212; 8.277.852 y 8.318.220. Después de producir la fracción de suero celular, se somete después la etapa de estabilización para producir la Composición Cosmética Obtenida de Suero. En una realización, la etapa de estabilización implica incubar la fracción de suero celular en una mezcla de al menos un conservante y al menos un antioxidante, para producir una fracción de suero celular estabilizada. Los conservantes adecuados para su utilización en la presente invención incluyen, por ejemplo, sorbato de potasio, benzoato de sodio, metilparabeno de sodio y ácido cítrico. Un ejemplo de antioxidante apropiado para su utilización en la presente invención es metabisulfito de sodio.

## 10 Ejemplos

Aunque en el presente documento se han representado y descrito en detalle realizaciones preferentes, será evidente para los expertos en la técnica relevante que se pueden hacer diversas modificaciones, adiciones, sustituciones y similares dentro del ámbito de la invención, como se define en las reivindicaciones que siguen.

### 15 Ejemplo 1 (Frecuencias),

Separación de jugos celulares a partir de perejil (*Petroselinum crispum*), diente de león (*Traxacam officinalis*), matricaria (*Chrysanthemum parthenium*), manzanilla alemana (*Chamomilla recutita*), caléndula (*Calendula officinalis*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), soja (*Glycine max*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), salvia (*Salvia officinalis*), algas laminariales (*Macrosystis pyrifera*), lirio (*Lilium bulbiferum*), loto (*Nelumbo nucifera*), ficus benghalensis (*Ficus benghalensis*), ficus Carica (*Ficus carica*), ficus Microcarpa (*Ficus microcarpa*), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), verdolaga (*Portulaca oleraceae*), manzana (*Pyrus malus*), limón (*Citrus limon*), planta de té (*Camellia sinensis*), todos ellos frescos. Los jugos celulares se prepararon como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 7.442.391. Estos jugos celulares representaron una dispersión coloidal que mantuvo su estabilidad después de la centrifugación a baja velocidad (3.000 g x 20 minutos). Estos jugos celulares se expusieron al tratamiento por pulsos de magnetrón utilizando control de espectrometría dieléctrica de banda ancha. El tratamiento continuó hasta que se desestabilizó el jugo celular, es decir, se tornó separable por centrifugación a baja velocidad (3.000 g x 20 min) en precipitado (fracción de membranas) y el correspondiente sobrenadante transparente sin clorofila (fracción de citoplasma/citosol). Durante el tratamiento anterior y después de la separación, la temperatura del jugo celular fue de  $\leq 37$  °C. En la Tabla 1 se presenta un resumen de los datos experimentales.

Tabla 1.

Familias de plantas	Especies de plantas	Frecuencia, GHz
<i>Apiaceae</i>	Perejil	$\geq 5,3$
<i>Asteraceae</i>	Diente de león	$\geq 5,0$
	Matricaria	$\geq 6,0$
	Manzanilla alemana	$\geq 3,8$
	Caléndula	PD*
<i>Fabaceae</i>	Alfalfa	$\geq 4,0$
	Trébol rojo	$\geq 4,0$
	Soja	$\geq 3,5$
<i>Lamiaceae</i>	Lavanda	$\geq 4,0$
	Salvia	$\geq 5,0$
<i>Laminariaceae</i>	Alga laminarial	$\geq 10,5$
<i>Liliaceae</i>	Lirio	$\geq 3,5$
	Loto	PD*
<i>Moraceae</i>	Ficus benghalensis	$\geq 4,5$
	Ficus carica	$\geq 5,0$
	Ficus microcarpa	$\geq 4,0$
<i>Poaceae</i>	Cebada	$\geq 4,0$
	Avena	$\geq 4,0$
<i>Portulacaceae</i>	Verdolaga	$\geq 5,0$
<i>Rosaceae</i>	Manzana	$\geq 7,0$

Familias de plantas	Especies de plantas	Frecuencia, GHz
<i>Rutaceae</i>	Limón	≥ 8,0
<i>Theaceae</i>	Planta de té	≥ 4,0
*) – Por determinar. No hay datos experimentales fiables todavía.		

Se utilizó el sobrenadante de jugo celular (fracción de citoplasma/citosol) para su procesamiento adicional.

5 **Ejemplo 2** (Disminución de la constante dieléctrica).

Separación de Jugos Celulares a partir de perejil (*Petroselinum crispum*), diente de león (*Traxacam officinalis*), matricaria (*Chrysanthemum parthenium*), manzanilla alemana (*Chamomilla recutita*), caléndula (*Calendula officinalis*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), soja (*Glycine max*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), salvia (*Salvia officinalis*), algas laminariales (*Macrosystis pyrifera*), lirio (*Lilium bulbiferum*), loto (*Nelumbo nucifera*), ficus benghalensis (*Ficus benghalensis*), ficus carica (*Ficus carica*), ficus microcarpa (Ficus microcarpa), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), verdolaga (*Portulaca oleraceae*), manzana (*Pyrus malus*), limón (*Citrus limon*), planta de té (*Camellia sinensis*), todos ellos frescos. Los jugos celulares se prepararon como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 7.442.391. Estos jugos celulares representaron dispersiones coloidales que mantuvieron su estabilidad después de la centrifugación a baja velocidad (3.000 g x 20 minutos). Estos jugos celulares se expusieron al tratamiento por pulsos de magnetron de corta duración (desde 10 segundos hasta 1 minuto) utilizando control por espectrómetro dieléctrico de banda ancha. El tratamiento continuó hasta lograr determinada disminución en el valor de la constante dieléctrica ( $\Delta\epsilon_0$ ) extrapolada a partir de un diagrama Cole-Cole de baja frecuencia y pérdidas dieléctricas mínimas del campo aplicado. Los valores de frecuencias de magnetron y el  $\Delta\epsilon_0$  requeridos para la separación del jugo celular en la fracción de membranas y la fracción de citoplasma/citosol correspondiente se presentan en la Tabla 2. En estas condiciones, se encontró que la centrifugación a baja velocidad (3.000 g x 20 minutos) de los jugos celulares era suficiente para la completa separación del precipitado que contiene clorofila (fracción de membranas) del sobrenadante transparente sin clorofila (fracción de citoplasma/citosol). Durante el tratamiento anterior y después de la separación, la temperatura del jugo celular fue de ≤ 37 °C. En la Tabla 2 se presenta un resumen de los datos experimentales.

Tabla 2.

Familias de plantas	Especies de plantas	Frecuencia, GHz	$\Delta\epsilon_0$ , F/m
<i>Apiaceae</i>	Perejil	≥ 5,3	4
<i>Asteraceae</i>	Diente de león	≥ 5,0	4
	Matricaria	≥ 6,0	6
	Manzanilla alemana	≥ 3,8	5
	Caléndula	PD*	AD *
<i>Fabaceae</i>	Alfalfa	≥ 4,0	9
	Trébol rojo	≥ 4,0	4
	Soja	≥ 3,5	4
<i>Lamiaceae</i>	Lavanda	≥ 4,0	2
	Salvia	≥ 5,0	3
<i>Laminariaceae</i>	Alga laminarial	≥ 10,5	10
<i>Liliaceae</i>	Lirio	≥ 3,5	6
	Loto	PD *	AD *
<i>Moraceae</i>	Ficus benghalensis	≥ 4,5	5
	Ficus carica	≥ 5,0	4
	Ficus microcarpa	≥ 4,0	5
<i>Poaceae</i>	Cebada	≥ 4,0	4
	Avena	≥ 4,0	4
<i>Portulacaceae</i>	Verdolaga	≥ 5,0	4
<i>Rosaceae</i>	Manzana	≥ 7,0	9



Familias de plantas	Especies de plantas	Frecuencia, GHz	$\Delta\sigma\sigma$ , F/m
<i>Rutaceae</i>	Limón	$\geq 8,0$	12
<i>Theaceae</i>	Planta de té	$\geq 4,0$	5
*) – Por determinar. No hay datos experimentales fiables todavía.			

Se utilizó el sobrenadante de jugo celular (fracción de citoplasma/citosol) para su procesamiento adicional.

### 5 **Ejemplo 3** (Disminución del Potencial de Superficie).

Separación de Jugos Celulares a partir de perejil (*Petroselinum crispum*), diente de león (*Traxacam officinalis*), matricaria (*Chrysanthemum parthenium*), manzanilla alemana (*Chamomilla recutita*), caléndula (*Calendula officinalis*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), soja (*Glycine max*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), salvia (*Salvia officinalis*), algas laminariales (*Macrosystis pyrifera*), lirio (*Lilium bulbiferum*), loto (*Nelumbo nucifera*), ficus benghalensis (*Ficus benghalensis*), ficus carica (*Ficus carica*), ficus microcarpa (*Ficus Microcarpa*), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), verdolaga (*Portulaca oleraceae*), manzana (*Pyrus malus*), limón (*Citrus limon*), planta de té (*Camellia sinensis*), todos ellos frescos. Estos jugos celulares se prepararon como se describe en la Patente de Estados Unidos 7.442.391. Estos jugos celulares representaron una dispersión coloidal que mantuvo su estabilidad después de la centrifugación a baja velocidad (3.000 g x 20 minutos). Estos jugos celulares se expusieron al tratamiento por pulsos de magnetrón de corta duración (desde 10 segundos hasta 1 minuto) utilizando control por espectrómetro dieléctrico de banda ancha. El tratamiento continuó hasta conseguir determinada disminución del valor del potencial de superficie del jugo celular, medido con un vibro-capacitor Kelvin Probe. Los valores de frecuencias de magnetrón y de disminución del valor del potencial de superficie ( $\Delta PS$ ) necesarios para la separación del jugo celular en la fracción de membranas y la fracción de citoplasma/citosol correspondiente, se presentan en la Tabla 3. En estas condiciones, se encontró que la centrifugación a baja velocidad (3.000 g x 20 minutos) de los jugos celulares era suficiente para la completa separación del precipitado que contiene clorofila (fracción de membranas) del sobrenadante transparente sin clorofila (fracción de citoplasma/citosol). Durante el tratamiento anterior y después de la separación, la temperatura del jugo celular fue de  $\leq 37$  °C. En la Tabla 3 se presenta un resumen de los datos experimentales.

Tabla 3

Familias de plantas	Especies de plantas	Frecuencia, GHz	$\Delta PS$ , mV
<i>Apiaceae</i>	Perejil	$\geq 5,3$	111
<i>Asteraceae</i>	Diente de león	$\geq 5,0$	248
	Matricaria	$\geq 6,0$	10
	Manzanilla alemana	$\geq 3,8$	30
	Caléndula	PD*	201
<i>Fabaceae</i>	Alfalfa	$\geq 4,0$	35
	Trébol rojo	$\geq 4,0$	8
	Soja	$\geq 3,5$	13
<i>Lamiaceae</i>	Lavanda	$\geq 4,0$	16
	Salvia	$\geq 5,0$	10
<i>Laminariaceae</i>	Alga laminarial	$\geq 10,5$	59
<i>Liliaceae</i>	Lirio	$\geq 3,5$	33
	Loto	PD*	34
<i>Moraceae</i>	Ficus benghalensis	$\geq 4,5$	16
	Ficus carica	$\geq 5,0$	56
	Ficus microcarpa	$\geq 4,0$	51
<i>Poaceae</i>	Cebada	$\geq 4,0$	52
	Avena	$\geq 4,0$	45
<i>Portulacaceae</i>	Verdolaga	$\geq 5,0$	19
<i>Rosaceae</i>	Manzana	$\geq 7,0$	74
<i>Rutaceae</i>	Limón	$\geq 8,0$	168
<i>Theaceae</i>	Planta de té	$\geq 4,0$	25

El sobrenadante de jugo celular (fracción de citoplasma/citosol) se utilizó para su procesamiento adicional.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la preparación de una fracción botánica a partir de jugo celular vegetal obtenido de biomasa vegetal fresca, donde el proceso comprende someter dicho jugo celular vegetal a un campo electromagnético a una frecuencia mayor que 3 GHz durante un tiempo eficaz para desestabilizar el jugo celular vegetal, produciendo una mezcla de jugo celular coagulada que comprende una fracción de membranas coagulada, y separar dicha fracción de membranas coagulada de dicha mezcla de jugo celular coagulada para producir una fracción bioactiva que comprende una fracción de citoplasma/citosol que está sustancialmente libre de dicha fracción de membranas, donde la temperatura de dicho jugo celular se mantiene a, o por debajo de, 40 °C.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde se desestabiliza dicho jugo celular vegetal sometiendo a dicho jugo celular vegetal a un campo electromagnético a una frecuencia desde mayor que 3 GHz hasta 7,0 GHz.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho campo electromagnético se genera mediante un magnetrón de alta potencia.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha separación de dicha fracción de membranas coagulada se lleva a cabo mediante filtración o centrifugación.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde la frecuencia de dicho campo electromagnético es desde mayor que 3,0 GHz hasta 6,0 GHz.
6. El método de la reivindicación 5, donde la temperatura de dicho jugo celular se mantiene en, o por debajo de, 30 °C.
7. El método de la reivindicación 6, donde la temperatura de dicho jugo se mantiene en, o por debajo de, 25 °C.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha fracción de citoplasma/citosol se estabiliza incubando dicha fracción de citoplasma/citosol en una mezcla de al menos un conservante y al menos un antioxidante, para producir la composición cosmética botánica bioactiva estable.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho conservante se selecciona del grupo que consiste en sorbato de potasio, benzoato de sodio, metilparabeno de sodio y ácido cítrico.
- 40 10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho antioxidante es metabisulfito de sodio.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha biomasa vegetal fresca se obtiene de una familia de plantas seleccionada de *Laminariaceae*, *Cladophoraceae*, *Fabeaceae*, *Teaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Poaceae* y *Moraceae*.
- 45 12. El método de la reivindicación 1, donde dicha biomasa vegetal fresca se selecciona del grupo que consiste en *Macrocystis porifera*, *Chaetomorpha*, *Medicago sativa*, *Trifolium pratense*, *Glycine max*, *Camellia sinensis*, *Calendula officinalis*, *Tanacetum parthenium*, *Chamomilla recutita*, *Lavandula angustifolia*, *Salvia officinalis*, *Nelumbo nucifera*, *Lilium bulbiferum*, *Avena sativa* y *Hordeum vulgare*.
- 50 13. El método de la reivindicación 1, donde dicha fracción bioactiva comprende la fracción de membranas coagulada.
14. Una composición cosmética botánica bioactiva estable que comprende una cantidad eficaz de la fracción de citoplasma/citosol que está sustancialmente libre de la fracción de membranas de la reivindicación 1.
- 55 15. Una composición cosmética botánica bioactiva estable que comprende una cantidad eficaz de la fracción de membranas de la reivindicación 1.
- 60 16. El método de la reivindicación 1, donde dicho método está sustancialmente libre de un disolvente extraño añadido, sustancialmente libre de agua extraña añadida o sustancialmente libre tanto de un disolvente extraño añadido como de agua extraña añadida.
17. El método de la reivindicación 16, donde dicho método está libre de un disolvente extraño añadido y de agua añadida.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la frecuencia de dicho campo electromagnético es desde mayor que 3,5 GHz hasta 6,0 GHz.

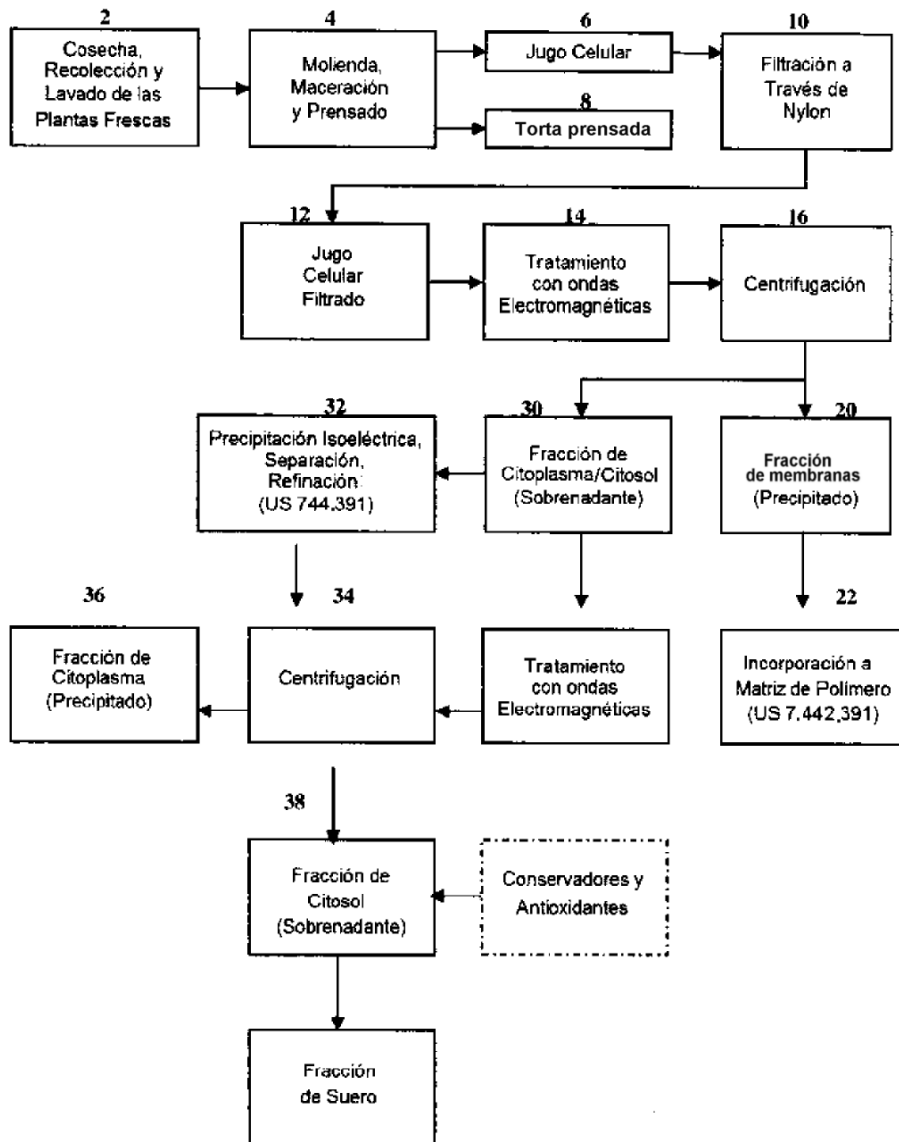


FIG. 1