

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 983**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2007.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2011 PCT/US2011/051066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12034060**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2011 E 11758339 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2613764**

54 Título: **Composiciones bioactivas que comprenden una fracción de suero de ficus y métodos para reducir la aparición de hiperpigmentación de la piel**

30 Prioridad:

10.09.2010 US 381442 P

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

11.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KOGANOV, MICHAEL

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 645 983 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

Composiciones bioactivas que comprenden una fracción de suero de *ficus* y métodos para reducir la aparición de hiperpigmentación de la piel

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 61/381,442, presentada el 10 de septiembre de 2010.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 10 La presente invención se refiere al campo del aclaramiento de la piel mediante la aplicación tópica de composiciones cosméticas para la piel. La invención se refiere además a composiciones tópicas para aclarar la piel que comprenden una fracción de suero de *Ficus*. La invención también se refiere a métodos para reducir la aparición de hiperpigmentación en piel mediante la aplicación tópica de la composición cosmética en las zonas hiperpigmentadas con el fin de alterar una o más etapas de la síntesis de melanina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 15 La piel humana comprende tres capas principales: la epidermis, la dermis y la capa de grasa subcutánea. La epidermis comprende cuatro capas (de arriba abajo): el estrato córneo, la capa granular, la capa espinosa y la capa basal. Entre el estrato córneo y la capa granular puede estar presente una quinta capa separada, el estrato lúcido. La capa basal produce células que migran gradualmente hacia arriba para formar las otras capas epidérmicas. Según estas células migran hacia arriba, pierden su núcleo central y comienzan a producir proteínas de la piel (queratinas) y grasas (lípidos). Estas células se identifican como queratinocitos cuando están presentes en las capas superiores de la epidermis. Los melanocitos son otra clase de células de la capa basal de la epidermis. Los melanocitos son responsables de la producción de melanina, que es el factor principal en la pigmentación de la piel.

- 25 La melanina es producida por un complejo conjunto de reacciones dentro del melanocito que implican, en un nivel básico, la enzima tirosinasa y L-tirosina como sustrato. La tirosinasa cataliza la conversión de L-tirosina en DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) y de DOPA a dopaquinona. La dopaquinona experimenta una conversión más para formar melanina. La melanina se reúne en organelas conocidas como melanosomas, que se transfieren a los queratinocitos a lo largo de unos filamentos delgados del melanocito conocidos como dendritas. Hay aproximadamente 1.500 productos génicos expresados en los melanosomas, 600 de ellos expresados en cualquier momento dado y 100 de ellos, según se cree, únicos del melanosoma. Además, hay muchos elementos reguladores implicados en la señalización, en el transporte de melanosomas dentro del melanocito y en la transferencia de melanosomas a los queratinocitos.

- 35 La producción de melanina puede desencadenarse por diversos procesos externos e internos. Por ejemplo, los melanocitos producen melanina adicional cuando se somete la piel a radiación UV. A continuación se transporta la melanina vía los melanosomas a los queratinocitos, que entonces dejan la piel con un aspecto "bronceado". Una vez que se elimina la luz UV, los melanocitos vuelven a los niveles normales de producción de melanina. Una inflamación puede iniciar una hiperpigmentación por estimulación directa de los melanocitos mediante mediadores tales como IL-1, endotelina-1 y/o factor de células madres. Las especies de oxígeno reactivo, tales como superóxido y óxido nítrico, generadas en la piel dañada o liberadas como subproductos por las células inflamatorias pueden ser estimuladoras de los melanocitos.

- 40 Con el tiempo, la exposición crónica a UV y otros factores de envejecimiento intrínsecos y extrínsecos pueden llevar a cambios permanentes de la expresión genética en los queratinocitos y/o melanocitos, cuyos resultados son unas manchas hiperpigmentadas relacionadas con la edad. Se ha informado de que los niveles de ARNm de algunos genes asociados con la melanogénesis (por ejemplo tirosinasa, TYRP1) aumentan los lentigos actínicos (manchas de envejecimiento). También puede haber una acentuación de la cascada de la endotelina epidérmica y un papel para el factor de las células madre en la hiperpigmentación. Estos cambios pueden dar como resultado una sobreproducción de melanina y manchas hiperpigmentadas resultantes que persisten incluso si se evita un ataque, tal como una exposición a UV. Incluso más allá de las manchas hiperpigmentadas, la exposición crónica a UV y otros factores de envejecimiento intrínsecos y extrínsecos pueden llevar a cambios más sutiles en el tono de la piel. Con frecuencia, estos cambios se describen como un tono irregular o como un aspecto moteado. Al menos un estudio sugiere que, a veces, las manchas de envejecimiento pueden añadir 10 o 12 años a la edad percibida de una persona y que la distribución de melanina puede conducir a una percepción de la edad dependiente del tono. Así, existe el deseo de proporcionar composiciones y métodos de tratamiento que puedan mejorar el aspecto de la piel hiperpigmentada, por ejemplo las manchas de envejecimiento.

En los últimos años, los consumidores demandan cada vez en mayor medida productos cosméticos “naturales”. Como resultado, los fabricantes de cosméticos han incorporado más materiales de origen vegetal en sus formulaciones cosméticas. Aunque durante cientos o incluso miles de años se han utilizado diversas plantas para diversas supuestas indicaciones, hasta hace poco no ha sido posible verificar clínicamente la pretendida
 5 eficacia ni identificar nuevos usos potenciales en base a la ciencia subyacente de la bioactividad de las plantas. Con los recientes avances en ciencia, los investigadores están ahora en mejor situación para evaluar la eficacia y/o nuevos usos potenciales de plantas que hasta hace poco sólo respaldaba el folklore. Debido a lo nuevo de la ciencia y debido a que el número de plantas que podrían utilizarse potencialmente como bioactivos cosméticos es tan inmenso, aún no se ha investigado por completo la gran mayoría de las plantas.

10 Muchos de los métodos utilizados para extraer componentes botánicos de las plantas conllevan técnicas que son perjudiciales para la composición del tejido de las plantas y/o los componentes bioactivos de interés contenidos en dicho tejido. Por consiguiente, con frecuencia, los métodos de extracción tradicionales no consiguen liberar todo el espectro de actividades que existe dentro de las células vegetales y, así, no se logra todo el potencial de las formulaciones cosméticas de origen botánico. Además, muchos métodos de extracción
 15 tradicionales utilizan disolventes químicos fuertes, que no son “naturales” y, por tanto, son materiales que los consumidores desean evitar aplicar sobre su piel. Además, estos procesos basados en disolventes producen residuos químicos tóxicos que pueden dañar el medio ambiente y no manejarse y eliminarse adecuadamente como residuos peligrosos.

20 Sin embargo, sólo porque un material sea “natural” no se garantiza que esté libre de sustancias no deseadas que harían el material inadecuado para el uso en la piel. Por ejemplo, muchas plantas contienen fotosensibilizadores, tales como feoforbidos, y/o alérgenos de contacto, como proteínas. En los niveles que se encuentran de forma natural en muchas plantas comunes, los feoforbidos y/o las proteínas no son motivo de preocupación para la mayoría de las personas. Sin embargo, cuando los materiales vegetales se condensan en una forma altamente concentrada, por ejemplo mediante extracción, estos materiales pueden estar
 25 presentes en niveles que causen irritación de la piel y reacciones alérgicas, incluyendo exantemas. Sin embargo, incluso cuando estos materiales están presentes en sus niveles naturales, existen muchos individuos sensibles que experimentan reacciones negativas en la piel.

Además, según aumenta la demanda de productos naturales, también lo hace el interés por proteger los recursos naturales mundiales. Muchos de los ingredientes “naturales” deseados por los consumidores se derivan de recursos biológicos que merman y/o se destruyen cuando se cosechan para el uso en productos de
 30 consumo. Así, el deseo de los consumidores de productos naturales más respetuosos con el medio ambiente puede llevar irónicamente a la destrucción de los muchos recursos biológicos que pretenden preservar.

Por tanto, se necesitan composiciones botánicas bioactivas naturales que mantengan su espectro de bioactividad deseada, sean adecuadas para la aplicación tópica sobre la piel y no se preparen utilizando disolventes químicos fuertes. Además, se necesitan composiciones cosméticas que contengan tales bioactivos
 35 que sean eficaces para reducir áreas de hiperpigmentación de la piel. Además, se necesitan materiales bioactivos tales que puedan cosecharse y procesarse de forma ecológicamente sana y sostenible.

A la luz de la siguiente descripción se harán patentes éstos y otros objetivos de la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

40 La presente invención proporciona una fracción de suero de *Ficus* derivada del jugo celular de hojas de *Ficus* frescas. La presente invención también proporciona composiciones cosméticas que comprenden una fracción de suero de *Ficus*. La fracción de suero de *Ficus* está presente en la composición en una cantidad eficaz para lograr el resultado de aclaramiento de la piel deseado.

45 La invención también se refiere a métodos para reducir la aparición de hiperpigmentación en la piel mediante una aplicación tópica de la composición cosmética en áreas hiperpigmentadas, con el fin de alterar una o más etapas de la melanogénesis.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Se cree que la presente invención se entenderá mejor a partir de la descripción siguiente, considerada
 50 juntamente con las figuras adjuntas. Las citadas figuras no deben considerarse como limitativas del alcance de la presente invención.

Fig. 1: dibujo esquemático del proceso para preparar la fracción de suero bioactiva a partir de hojas de *Ficus* frescas.

Fig. 2: cromatograma CL/UV del extracto de *Ficus* tradicional superpuesto al de la fracción de suero de *Ficus*, que muestra que el extracto tradicional contiene mayores niveles de compuestos de
 55 elución tardía (más hidrófobos), que no se detectan en la fracción de suero de *Ficus*.

- Fig. 3:** cromatograma CL/UV de los compuestos de elución tardía del extracto de *Ficus* tradicional y su cromatograma de iones extraídos correspondiente, que los identifica como feoforbidos, compuestos pigmentarios que son productos de degradación de la clorofila.
- 5 **Fig. 4:** cromatograma CL/UV del extracto de *Ficus* tradicional superpuesto al de la fracción de suero de *Ficus*, que muestra que el extracto tradicional contiene mayores niveles de glucósidos de flavonol.
- Fig. 5:** parte del cromatograma CL/UV del extracto de *Ficus* tradicional y el cromatograma de iones extraídos correspondiente, superpuesto al de la fracción de suero de *Ficus*, que muestra que la fracción de suero de *Ficus* contiene aproximadamente diez veces (10x) el nivel de catequinas y taninos condensados relacionados contenido en el extracto de *Ficus* tradicional.
- 10 **Fig. 6:** parte del cromatograma CL/UV del extracto de *Ficus* tradicional y el cromatograma de iones extraídos correspondiente, superpuesto al de la fracción de suero de *Ficus*, que muestra que los niveles de tres isómeros de ácido cafeoilquinico no parecían ser sustancialmente diferentes entre las dos muestras.
- 15 **Fig. 7:** parte del cromatograma CL/EM del extracto de *Ficus* tradicional superpuesto al de la fracción de suero de *Ficus*, que muestra que los niveles de tirosina, fenilalanina y triptófano libres son mayores en la fracción de suero de *Ficus*.
- Fig. 8:** dos fotografías en color de un estudio de envejecimiento acelerado, que muestran la estabilidad cromática del extracto de *Ficus* de hoja seca en relación con la FSF de dos composiciones cosméticas diferentes que comprenden niveles de fracción de suero de *Ficus* diferentes y conservantes diferentes.
- 20 **Fig. 9:** gráfico de calibrado para el estudio de envejecimiento acelerado de la Fig. 8.
- Fig. 10:** fotografía en color del estudio de envejecimiento acelerado, en el que se comparan un vehículo que contiene un 0,55% de FSF y diversas concentraciones de conservante.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Todos los porcentajes y proporciones utilizados aquí son en peso de la composición total y todas las mediciones se realizan a 25°C, a no ser que se indique otra cosa.

- 30 Las composiciones de la presente invención pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en los componentes esenciales, así como en los ingredientes opcionales aquí descritos. Tal como se utiliza aquí, “consistente esencialmente en” significa que la composición o el componente pueden incluir ingredientes adicionales, pero sólo si los ingredientes adicionales no alteran esencialmente las características básicas y nuevas de las composiciones o métodos reivindicados.

- 35 Los términos “aplicar” o “aplicación”, tal como se utilizan con referencia a una composición, significan aplicar o extender las composiciones de la presente invención sobre una superficie de piel humana, tal como la epidermis.

El concepto “dermatológicamente aceptable”, tal como se utiliza aquí, significa que las composiciones o componentes descritos son adecuados para su uso en contacto con tejido de piel humana sin excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares.

- 40 El concepto “cantidad segura y eficaz”, tal como se utiliza aquí, significa una cantidad de un compuesto o composición suficiente para inducir de forma significativa un beneficio positivo.

- 45 El concepto “hiperpigmentación postinflamatoria”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un aumento de agudo a crónico de la pigmentación en respuesta a un proceso inflamatorio transitorio. La hiperpigmentación postinflamatoria predomina particularmente en sujetos de piel oscura, aunque no está limitada a éstos. Normalmente, la hiperpigmentación postinflamatoria disminuye una vez que se disipa el proceso inflamatorio transitorio. Entre los ejemplos de procesos inflamatorios transitorios se incluyen, de forma no exclusiva, lesiones por acné, pelos encarnados, arañazos, picaduras de insectos, daños por agentes tensioactivos y exposición a UV de corta duración.

- 50 El concepto “mancha hiperpigmentada”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un área de piel definida donde la pigmentación es mayor que la de un área de piel adyacente debido a una sobreproducción de melanina localizada y crónica o sistémica. Normalmente, las manchas hiperpigmentadas tienen un diámetro entre aproximadamente 2 mm y aproximadamente 10 mm, pero son posibles manchas más pequeñas o más grandes. Entre las manchas hiperpigmentadas pueden incluirse uno o más de las siguientes: manchas de envejecimiento, manchas causadas por el sol, lentigos solares, lesiones hipomelanóticas, pecas y manchas por melasma.

- 55 El concepto “manchas de envejecimiento”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una mancha hiperpigmentada donde la pigmentación se debe a una sobreproducción localizada y crónica de melanina por factores de envejecimiento intrínsecos o extrínsecos.

El concepto “agente de tono de piel”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un agente que regula las señales de producción de melanina, la síntesis de melanina, la transferencia sistémica de melanina entre el melanocito y

el queratinocito y/o la degradación de melanina. Los agentes de tono de piel pueden mejorar el aspecto de un tono de piel irregular actuando como agente cosmético aclarador o reductor de la pigmentación.

5 El concepto “tono de piel”, tal como se utiliza aquí, se refiere al aspecto general de la melanina en la piel causado por la síntesis sistémica, más que transitoria, de melanina. El tono de piel se caracteriza normalmente en un área grande de la piel. El área puede ser idealmente de 100 mm², pero están previstas áreas más grandes, tales como la totalidad de la piel facial o cualquiera de las superficies de la piel facial. El tono de piel se puede medir mediante análisis de imágenes. Por ejemplo, la luminosidad general se puede medir mediante la coordenada L* en un espacio de color L*a*b (Comisión Internacional de Iluminación). Como indicador del 10 tono de piel general puede utilizarse un mapeo de cromóforos, tal como el mapeo de melanina y la concentración de melanina. La melanina media se puede calcular a partir de los datos del mapa de cromóforos. Adicionalmente, la uniformidad del tono de piel se puede determinar mediante la uniformidad de la melanina, que también se puede calcular a partir de los datos del mapa de cromóforos. En el siguiente ejemplo se exponen técnicas de mapeo de cromóforos adecuadas.

15 El concepto “superficie de la piel facial”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una o más de las superficies de piel de la frente, periorbitarias, de la mejilla, periorales, de la barbilla y de la nariz.

El concepto “extracto tradicional”, tal como se utiliza aquí, se refiere a los extractos producidos mediante extracción con disolventes de compuestos del material vegetal; el material vegetal puede ser material vegetal deshidratado (es decir seco) y/o no deshidratado (por ejemplo fresco o sólo parcialmente deshidratado).

I. Composiciones

20 La presente invención se refiere a diversas composiciones y, más específicamente, a composiciones para ser aplicadas sobre una superficie de piel. Las composiciones pueden estar en una amplia variedad de formas de producto que incluyen, de forma no exclusiva, soluciones, suspensiones, lociones, cremas, geles, tonificantes, barras, lápices, aerosoles, ungüentos, líquidos de lavado de limpieza y barras sólidas, champús y acondicionadores capilares, pastas, espumas, polvos, mousses, cremas de afeitar, toallitas, tiras, parches, 25 parches con alimentación eléctrica, vendajes para heridas y apósitos adhesivos, hidrogeles, productos filmógenos, máscaras faciales y cutáneas (con y sin lámina insoluble), maquillajes tales como maquillaje de fondo, delineadores de ojos y sombras de ojos, y similares. La forma de la composición se puede derivar del vehículo dermatológicamente aceptable particular elegido, si está presente en la composición.

30 Las composiciones de la presente invención son útiles para reducir la aparición de hiperpigmentación de la piel asociada a la melanina. Tal como se utiliza aquí, “reducir la aparición visible de hiperpigmentación de la piel” incluye aclarar la piel. El aclaramiento de la piel implica disminuir, minimizar y/o hacer desaparecer la melanina existente en la piel (terapéutico) y/o retrasar, minimizar y/o impedir la formación de melanina en la piel (profiláctico), incluyendo zonas de la piel hiperpigmentadas. Tal como se utiliza aquí, “zona hiperpigmentada” 35 significa una zona localizada de alto contenido de melanina e incluye manchas de envejecimiento, manchas hepáticas, máculas cutáneas, moteado, melasma, cloasma, pecas, hiperpigmentación postinflamatoria o manchas pigmentadas inducidas por el sol.

A. Fracción de suero de *Ficus*

40 El género *Ficus*, la higuera, consta de numerosas especies y se encuentra en todo el mundo. El género *Ficus* no debería confundirse con la especie ficus, la chumbera *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, Cactaceae (Barbera et al., PAST AND PRESENT ROLE OF THE INDIAN-FIG PRICKLY-PEAR (OPUNTIA FICUS-INDICA (L.) MILLER, CACTACEAE) IN THE AGRICULTURE OF SICILY *Economic Botany* 46(1):10-20. 1992). Entre las especies notables del género higuera se incluyen *Ficus carica* (higuera común), *Ficus religiosa* (el árbol de Bo bajo el que se refugió Buda cuando profetizó las “Verdades”), 45 *Ficus elastica* Roxb. exHorneum. (el árbol del caucho), *Ficus behghalensis* (baniano) y *Ficus racemosa* (sin. glomerata, higuera clúster gigante).

50 Dentro de la categoría general de frutos, los higos son ejemplos de siconos, frutos múltiples con una estructura “dentro-fuera” distintiva. Éstas comprenden conjuntos de drupillas, que son receptáculos huecos y carnosos, cada una con una pequeña abertura en el ápice denominado ostiolo. Las flores diminutas están agrupadas sobre las paredes interiores y no son visibles externamente.

55 Como uno de los alimentos humanos más antiguos conocidos, las spp. de *Ficus* (higueras) tienen un prolongado perfil de seguridad. A lo largo de la historia se han utilizado frutos frescos o secos, corteza del árbol, hojas, ramitas, látex y ramas tiernas de higuera para diversos propósitos. Entre algunos de estos usos históricos se incluyen el tratamiento de llagas, úlceras, crecimientos cancerosos, tumores, abscesos, gota, tos crónica, problemas pulmonares, diarrea crónica, estreñimiento, reumatismo, gonorrea, hemorroides, diabetes, vómitos, eccema, lepra y verrugas.

La fracción de suero de *Ficus* (en lo que sigue “FSF”) de la presente invención se deriva del jugo celular de hojas de *Ficus* frescas. El jugo celular separado mecánicamente de las hojas frescas se fracciona utilizando ajustes de pH, radiación de microondas concentrada, separación centrífuga y filtración esterilizante para

obtener una fracción de suero de *Ficus* libre de feoforbidos y libre de proteínas. La fracción de suero de *Ficus* resultante consiste esencialmente en el citoplasma celular de la hoja de *Ficus*. En formas de realización concretas, el jugo celular de *Ficus* se deriva de las especies de *Ficus* seleccionadas del grupo consistente en *F. benghalensis*, *F. carica*, *F. elastica*, *F. microcarpa*, *F. trigonata* y combinaciones de las mismas.

- 5 Las composiciones de la presente invención incluyen una cantidad segura y eficaz de fracción de suero de *Ficus*. La composición puede contener FSF en una cantidad de un 0,01% a un 50%, en una forma de realización de un 0,05% a un 20%, en otra forma de realización de un 0,2% a un 10%, en peso con respecto a la composición. En otra forma de realización más, la composición comprende entre un 1% y un 5%, y en otra forma de realización más entre un 1% y un 3%, de FSF en peso con respecto a la composición total.
- 10 Los presentes investigadores han descubierto que la fracción de suero de *Ficus* produce efectos de aclaramiento de la piel superiores a los de un extracto de *Ficus* tradicional, incluyendo el aclaramiento de zonas hiperpigmentadas de la piel de los mamíferos, cuando se aplica tópicamente en la piel. La presente invención no ha de verse restringida a teorías existentes, sino que se cree que funciona mediante la inhibición de procesos involucrados en la producción de melanina (melanogénesis), incluyendo impedir la estimulación de oxígeno reactivo/radicales de oxígeno (estrés oxidativo) de los melanocitos, que tiene como resultado el inicio de la vía de producción de melanina dentro de los melanocitos (que puede ocurrir por ejemplo con la exposición a luz UV o la luz solar).

Preparación de la fracción de suero de *Ficus*

- 20 El método utilizado para separar compuestos de la materia vegetal, tales como extracción con disolvente, determina qué compuestos se aíslan. De acuerdo con el principio general de "semejante disuelve a semejante", la elección del disolvente de extracción determina en gran medida el tipo y el número de compuestos que resultarán de cualquier técnica de extracción en particular. Por ejemplo, los compuestos polares se extraen utilizando disolventes polares, mientras que los compuestos no polares se extraen utilizando disolventes no polares. Esto tiene como resultado el aislamiento de sólo un pequeño intervalo de componentes del espectro total de componentes que pueden estar presentes. La Tabla 1x siguiente resume los distintos tipos de compuestos que normalmente se extraen utilizando disolventes comunes en un intervalo de polaridades diferentes.

Tabla 1x Extracción con disolventes tradicional

	Ceras	Grasas	Aceites	Alca- loides	Agli- conas	Glucó- sidos	Proteínas	Azúcares
Hexano	●	●	●					
Tolueno		●	●	●				
Dietil éter				●	●			
Acetona				●	●	●		
Etanol						●		
Agua						●	●	●
Polaridad cresciente						●	●	●

Fuente: *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*, Houghton & Raman, 1998

- 30 La fracción de suero de *Ficus* de la invención actual no se prepara mediante extracción con disolventes, sino que más bien se prepara separando del resto de la materia vegetal el jugo celular fresco que se encuentra en las hojas de las plantas. Este jugo celular, dado que no ha sido sometido a un proceso de extracción, contiene el espectro completo de compuestos que se encuentra en las hojas de *Ficus* frescas. En cambio, los extractos contienen sólo el estrecho intervalo de compuestos que pueden separarse con un disolvente en particular. Así,
- 35 la fracción de suero de *Ficus* resultante contiene un rango de compuestos potencialmente activos mucho más amplio que el contenido en un extracto.

Además, muchos extractos no se preparan a partir de hojas frescas, sino más bien a partir de material vegetal seco, que ha experimentado una degradación por la deshidratación. Durante la deshidratación, las paredes celulares se ven comprometidas, lo que causa la degradación de compuestos por mecanismos tales como hidrólisis, oxidación, polimerización, reacciones de Maillard e isomerización. Cuando se extraen hojas secas, el extracto resultante contiene por tanto estos productos de degradación, que no estaban originalmente presentes en la materia vegetal fresca; además, el extracto contiene sólo el rango de compuestos que pueden aislarse con el disolvente en particular. Por consiguiente, la composición del extracto de hojas secas resultante es muy diferente de la de la fracción de suero de *Ficus*.

El método para preparar una composición de fracción de suero de *Ficus* comprende los pasos de: (a) separar jugo celular de *Ficus* a partir de hojas de *Ficus* limpias, frescas y no marchitadas para obtener un jugo celular de *Ficus* fresco, no añadiéndose ningún líquido exógeno antes de dicha separación o durante la misma; (b) filtrar dicho jugo celular de *Ficus* fresco para obtener un jugo celular libre de fibras; y (c) fraccionar dicho jugo celular libre de fibras con el fin de obtener la fracción de suero de *Ficus*. El paso de fraccionamiento comprende los pasos de: (1) eliminar la clorofila de dicho jugo celular libre de fibras para obtener un Sobrenadante I; (2) eliminar pigmentos y proteínas del Sobrenadante I para formar la fracción de suero de *Ficus*; y (3) opcionalmente añadir un estabilizante a dicha fracción de suero de *Ficus*.

En algunas formas de realización, el estabilizante se selecciona del grupo consistente en antioxidantes, agentes quelantes, conservantes y mezclas de los mismos. En formas de realización concretas, el estabilizante se selecciona del grupo consistente en metabisulfito de sodio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, metilparabeno sódico, pentilenglicol y mezclas de los mismos.

En formas de realización concretas, el paso de eliminar la clorofila del jugo celular libre de fibras comprende: (i) ajustar el pH de dicho jugo celular libre de fibras a aproximadamente 3 para obtener un jugo celular libre de fibras de pH ajustado; (ii) calentar dicho jugo celular libre de fibras de pH ajustado a aproximadamente 90°C durante aproximadamente 1 minuto; (iii) enfriar dicho jugo celular libre de fibras de pH ajustado a aproximadamente 30°C; y (iv) separar dicho jugo celular libre de fibras de pH ajustado en el Precipitado I y el Sobrenadante I.

En formas de realización concretas, la eliminación de pigmentos y proteínas del Sobrenadante I comprende: (i) ajustar el pH del Sobrenadante I a 7,5 para formar un Sobrenadante I de pH ajustado; (ii) separar el Sobrenadante I de pH ajustado en un Precipitado II y un Sobrenadante II; (iii) ajustar el pH del Sobrenadante II a 3,6 para formar un Sobrenadante II de pH ajustado; y (iv) separar el Sobrenadante II de pH ajustado en un Precipitado III y la fracción de suero de *Ficus*.

Para preparar la fracción de suero de *Ficus* se utilizan hojas de *Ficus* frescas. El método de preparación mantiene aquí la integridad de los componentes bioactivos inherentemente presentes en las hojas de *Ficus*, con el resultado de que la fracción de suero de *Ficus* tiene una actividad superior. Durante la cosecha y el transporte se pone cuidado de preservar la integridad de la hoja, con el fin de minimizar factores medioambientales tales como pérdidas de humedad y degradación biológica. Todos los pasos se completan en el menor tiempo posible para minimizar la exposición de las hojas frescas al sol, a altas temperaturas y a otros factores medioambientales negativos.

En formas de realización concretas, las hojas de *Ficus* se seleccionan del grupo de especies de *Ficus* consistente en *F. benghalensis*, *F. carica*, *F. elastica*, *F. microcarpa*, *F. trigonata* y combinaciones de las mismas.

La cosecha, por ejemplo a mano o por corte mecánico, se lleva a cabo de manera que se evite o se minimice la picadura, la trituración, el aplastamiento u otro tipo de daños a la hoja. La cosecha y el transporte deberían llevarse a cabo de manera que se evite el marchitamiento debido a la pérdida de humedad. En una forma de realización, las hojas de *Ficus* frescas utilizadas para preparar la fracción de suero de *Ficus* contienen al menos un 90% de su contenido de humedad original, en otra forma de realización al menos un 95%, y en otra forma de realización al menos un 98%, del contenido de humedad original presente en el momento de la cosecha.

Dado que es posible cosechar de una vez hasta un 30% de las hojas de una planta de *Ficus* sin afectar negativamente a la viabilidad de la planta, en una misma planta pueden volver a crecer numerosas veces hojas para una futura cosecha. Así, a lo largo de toda su vida natural, la planta de *Ficus* puede seguir creciendo y ser parte del ecosistema circundante, mientras proporciona repetidas veces cosechas de hojas para preparar composiciones cosméticas bioactivas. Se prefiere este método de cosecha, ya que favorece la sostenibilidad de los recursos naturales.

Aunque no como preferidos, pueden utilizarse también métodos de recogida menos sostenibles, tales como una cosecha mecánica a gran escala que elimine la mayor parte de la planta y no deje una parte viable para la regeneración. Sin embargo, incluso con este método de cosecha más agresivo, se pone cuidado de minimizar los daños a las hojas de *Ficus* que puedan llevar a un crecimiento microbiano, una pérdida de humedad, una intensificación de la oxidación, polimerización, isomerización y procesos de hidrólisis (es decir procesos catabólicos no deseados) en las hojas recogidas. Por ejemplo, en una forma de realización de la presente

invención, las plantas de *Ficus* se cortan y se recogen a mano como plantas completas. En otra forma de realización, las hojas de las plantas se cortan utilizando equipos de cosecha.

5 El tiempo de entrega del material vegetal cortado a la instalación de procesamiento y la exposición de las hojas al sol, a altas temperaturas y a otros factores medioambientales negativos debería minimizarse para impedir el impacto de procesos de degradación no deseados, como se describe más arriba. Por ejemplo, en una forma de realización de la presente invención, el tiempo de entrega de la planta para su posterior procesamiento no sobrepasa los 30 minutos desde el momento del corte. En otra forma de realización, las plantas que se someten a un transporte de larga distancia se tratan con un procedimiento posterior al corte que implica colocar inmediatamente las hojas de *Ficus* en neveras portátiles de poliestireno que contienen bolsas de paquetes de gel congelado para ayudar a mantener la frescura y el contenido de humedad natural durante la entrega nocturna a la instalación de procesamiento. También pueden utilizarse otros procedimientos posteriores al corte que logren los resultados arriba descritos.

15 A continuación, las hojas de *Ficus* se lavan con cuidado para eliminar las partículas de tierra y otros restos antes del procesamiento. En una forma de realización, el lavado se realiza utilizando un enjuague a baja presión durante un breve tiempo en condiciones tales que se impida el inicio de la liberación del jugo celular de las hojas, no se provoquen daños, ni se eliminen componentes valiosos. Por ejemplo, en una forma de realización de la presente invención, el lavado de las hojas de *Ficus* se lleva a cabo en menos de 5 minutos o en 5 minutos con una presión de agua inferior o igual a 1 kg/cm². El agua de lavado residual no debería contener ningún pigmento verde o amarillo; la ausencia de tales pigmentos indica la ausencia de daños subsiguientes. A 20 continuación se elimina el agua excedente de las hojas lavadas, con el fin de mantener el contenido de materia seca tan próximo al nivel natural como sea posible.

A continuación, las hojas de *Ficus* frescas lavadas se separan mecánicamente para liberar el jugo celular, que contiene la mayor parte del material intracelular de las células parenquimatosas, del material enriquecido con fibras, que contiene predominantemente paredes celulares. Es importante el hecho de que durante el proceso de separación no se añade ningún disolvente exógeno (por ejemplo agua, hexano, acetona, etanol). Tal como se utiliza aquí, “disolvente exógeno” significa cualquier disolvente que no esté inherentemente presente en el material vegetal, sino que se ponga en contacto con el material vegetal con el propósito de separar (por ejemplo extraer) compuestos del material vegetal.

30 La liberación del jugo celular de las hojas lavadas comprende triturar, macerar y prensar para obtener el contenido intracelular líquido (es decir el jugo celular) y para separarlo del material rico con fibras. En una forma de realización se utiliza un molino de martillo (Model VS 35, Vincent Corporation, Tampa, FL), con un motor de 5 CV y un juego de tamices, para triturar las hojas y producir partículas de tejido de hoja a un tamaño pequeño adecuado, en un espacio de tiempo muy breve y sin aumentar significativamente la temperatura de la biomasa. En esta forma de realización, el molino de martillo se ajusta para producir un tamaño máximo de partículas de hoja maceradas $\leq 2,0$ centímetros durante ≤ 10 segundos de tratamiento, aumentándose la temperatura de las 35 hojas frescas maceradas en una medida inferior o igual a sólo $\leq 2^{\circ}\text{C}$.

40 La exposición de las hojas de *Ficus* trituradas y maceradas se minimiza para impedir el impacto de procesos catabólicos no deseados, como se describe más arriba. Las hojas de *Ficus* se procesan en un corto espacio de tiempo y sin un aumento de temperatura significativo. Inmediatamente después de la trituración y la maceración, las hojas de *Ficus* se prensan para obtener jugo celular de las hojas frescas maceradas. En una forma de realización, esto se lleva a cabo utilizando una prensa de husillo horizontal continua (Compact Press “CP-6”, Vincent Corporation, Tampa, FL), equipada con un cono soportado mediante aire comprimido. En esta forma de realización, la presión en el cono se mantiene en un nivel mayor o igual a 15 kg/cm², la velocidad del husillo es de 12 rpm y el aumento de temperatura del jugo celular es menor o igual a 5°C.

45 Este tratamiento produce material enriquecido con fibras y jugo celular. A continuación se eliminan del jugo celular las partículas de fibra pequeñas residuales, dado que éstas pueden absorber componentes valiosos del jugo celular y también pueden bloquear las mangueras y las bombas de los equipos. Por ejemplo, estas partículas pueden eliminarse mediante filtración o centrifugación a baja velocidad. En una forma de realización, estas partículas se eliminan por clarificación utilizando una centrífuga de flujo continuo (Model 12-413V, AML Industries, Inc., Hatboro, PA) con una unidad de descarga totalmente automática. Con un caudal de 2 50 litros/minuto, el tiempo de retención para la clarificación del jugo celular a ≤ 2.250 g es ≥ 100 segundos. Este régimen produce jugo celular libre de fibras. El precipitado que contiene partículas de fibra pequeñas se recoge y se combina con el resto del material rico en fibras producido después de prensar las hojas frescas.

55 En este momento, si se desea, el jugo celular puede congelarse en recipientes herméticos al aire y no reactivos para conservarlo para un procesamiento posterior. En una forma de realización, el jugo celular se coloca enseguida en recipientes de HDPE (polietileno de alta densidad) rectangulares de 15 litros cerrados herméticamente y se congela a -30°C . El jugo celular congelado en estado sólido se mantiene a esta baja temperatura para su posterior utilización.

60 A continuación, el jugo celular congelado puede pasarse de nuevo al estado líquido, preferiblemente por fluidización durante un corto espacio de tiempo (por ejemplo inferior o igual a 2 minutos) y con un aumento

mínimo de la temperatura del jugo celular (por ejemplo inferior o igual a 20°C) durante la fluidización. El corto periodo de fluidización y el poco aumento de temperatura minimizan ambos la desnaturalización y el daño oxidativo al jugo celular. El resultado es un jugo celular que tiene propiedades fisicoquímicas y bioquímicas esencialmente idénticas a las medidas antes de la congelación.

- 5 El jugo celular incluye tres tipos principales de componentes: (i) cloroplastos limitados por membrana, mitocondrias, retículo endoplasmático, núcleos, lisosomas, peroxisomas, vacuolas, aparato de Golgi; y (ii) ribosomas no limitados por membrana, microtúbulos; y (iii) componentes que no pertenecen a los grupos anteriores, tales como citoplasma. Debido a la presencia en el jugo celular de organelas y sus fragmentos, así como de pigmentos y proteínas no deseados, se requiere un fraccionamiento para producir un ingrediente de
- 10 cuidado personal que tenga una combinación deseable de propiedades funcionales, incluyendo, de forma no exclusiva, el color, la solubilidad, la transparencia, la estabilidad y las actividades *in vitro*.

El jugo celular se fracciona utilizando diversos tratamientos, que incluyen ajustes de pH, radiación de microondas concentrada, separación centrífuga y filtración al vacío. A continuación, la fracción de suero de jugo celular aislada resultante se estabiliza con conservantes y antioxidantes para producir la fracción de suero de *Ficus* final.

15

El pH del jugo celular se ajusta a $\geq 3,0$ (ajuste de pH 1). En una forma de realización, el pH del jugo celular, que es próximo al neutro (7,0), se ajusta empleando un método de titulación en el que se utiliza ácido clorhídrico (HCl) 5,0N para disminuir el pH del jugo celular a $\geq 3,0$ (ajuste de pH 1).

- A continuación se elimina la clorofila del jugo celular ajustado. Además de la presencia no deseada de este pigmento en los ingredientes cosméticos, la clorofila puede transformarse en feoforbidos, que se consideran compuestos tóxicos (Bergstrom, L.C., Vucenik, I., Hagen, I.k., Chernomorsky S.A., Poretz R.D. In-vitro photocytotoxicity of lysosomotropic immunoliposomes containing pheophorbide a with human bladder carcinoma cells. - J. Photochem. Photobiol., 24, 1, 17 - 23, 1994) y responsables de una irritación de la piel (Kato T., Yamada K. Relationship between appearance of photosensitization and total pheophorbide level in spirulina powder. - J. Food Hyg. Soc. Japan, 36, 632 634, 1995).
- 20
- 25

En una forma de realización, la eliminación de la clorofila se realiza calentando y enfriando a continuación el jugo celular ajustado, a lo que sigue una separación del precipitado del sobrenadante. En una forma de realización concreta, el jugo celular ajustado se trata inmediatamente mediante radiación de microondas concentrada a una frecuencia de 2.450 MHz. Durante este procesamiento con microondas concentradas (FMP = *Focused Microwave Processing*), la temperatura del jugo celular se aumenta momentáneamente a 90°C, se mantiene a esta temperatura durante 1 minuto y a continuación la temperatura del jugo celular se disminuye inmediatamente a $\leq 30^\circ\text{C}$. Después, el jugo celular tratado se separa rápidamente utilizando una centrifuga de flujo continuo CEPA LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Alemania) a 15.000 rpm y con un tiempo de retención ≥ 30 segundos. La separación del jugo celular tratado produce una pasta de precipitado de color verde ("Precipitado I") y un sobrenadante líquido ligeramente opalescente de color marrón claro ("Sobrenadante I"). Este Sobrenadante I se utiliza para un fraccionamiento posterior.

30

35

El Sobrenadante I se trata adicionalmente para eliminar en la mayor medida posible pigmentos marrones y otros compuestos no deseados, incluyendo proteínas residuales. Este tratamiento incluye un ajuste de pH y una separación. El pH del Sobrenadante I se ajusta para aumentar el pH a aproximadamente 7,5 (ajuste de pH 2). En una forma de realización, el ajuste de pH 2 se realiza mediante un método de titulación donde se utiliza hidróxido de sodio (NaOH) al 50% para aumentar el pH del Sobrenadante I de jugo celular de $\sim 3,0$ a $\sim 7,5$ (ajuste de pH 2). El ajuste de pH 2 tiene como resultado un color más oscuro del material y una opalescencia desarrollada, que a continuación se clarifica mediante separación. En una forma de realización, la clarificación se realiza utilizando una centrifuga de flujo continuo CEPA LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Alemania) a 15.000 rpm y con un tiempo de retención ≥ 30 segundos. Esta separación tiene como resultado una pasta de precipitado de color marrón (Precipitado II) y un sobrenadante ligeramente opalescente de color marrón (Sobrenadante II).

40

45

A continuación se ajusta el pH del Sobrenadante II (ajuste de pH 3) y se filtra. El pH del Sobrenadante II se ajusta para disminuir el pH a aproximadamente 3,6 (ajuste de pH 3). En una forma de realización, el Sobrenadante II se somete a una titulación utilizando ácido clorhídrico (HCl) 5,0N para disminuir el valor pH a un pH $\sim 3,6$ (ajuste de pH 3). Tal tratamiento lleva a un color más claro del Sobrenadante II titulado, aunque su opalescencia aumenta ligeramente. El Sobrenadante II de pH ajustado se trata por filtración esterilizante a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,2 micrómetros. El filtrado resultante es una fracción de suero de *Ficus* (FSF) transparente de color claro. La FSF consiste esencialmente en el citoplasma celular de las hojas de *Ficus*.

50

55

Puede lograrse una estabilización adicional de la fracción de suero añadiendo antioxidantes, estabilizantes, agentes quelantes y conservantes. En una forma de realización se añaden a la fracción de suero de *Ficus* los siguientes aditivos: 0,2% de metabisulfito de sodio, 0,1% de sorbato de potasio, 0,1% de benzoato de sodio y 0,1% de metilparabeno sódico. En esta forma de realización, la mezcla se incuba hasta lograr una solubilización completa de los aditivos (≥ 30 minutos). A continuación se añadió un 1,9% de pentilenglicol a la mezcla.

60

Propiedades de la FSF

La FSF resultante muestra propiedades que la hacen deseable para el uso como ingrediente cosmético. Entre estas propiedades se incluyen la estabilidad, la solubilidad en agua, la ausencia de materiales no deseables, tales como feoforbidos y proteínas, un color más claro, un mayor contenido de sólidos y la presencia de altos niveles de compuestos deseables, tales como fenilalanina.

Los estudios de estabilidad indican que los ingredientes cosméticos producidos a partir de FSF mediante estos métodos son estables a temperatura ambiente durante al menos 6 meses. Tal como se utiliza aquí, "estable" significa que no se produce ningún cambio significativo en las propiedades físicas o químicas de la composición durante el periodo de tiempo especificado cuando se almacena en una zona oscura y seca a TPE (temperatura y presión estándar: 25°C, 1 atm). Entre estas propiedades se incluyen el color y la composición química. En algunas formas de realización, la FSF y las composiciones que la comprenden son estables durante al menos 6 meses, en otras durante al menos 12 meses y en otras más durante al menos 24 meses. En formas de realización concretas, las composiciones son estables durante 6 a 24 meses, entre 12 y 24 meses o entre 6 y 12 meses.

Solubilidad en agua

Las FSF de la presente invención son también solubles en agua. Tal como se utiliza aquí, "soluble en agua" significa que la FSF es miscible con agua en cualquier proporción (a TPE). Dado que la FSF es soluble en agua, permite una mayor flexibilidad a la hora de formular composiciones que comprendan *Ficus*. Por ejemplo, los consumidores con frecuencia desean formulaciones de base acuosa por su sensación no grasienta, su conveniente facilidad para extenderlas, su sensación suave en la piel y la facilidad para eliminarlas (por ejemplo aclarado) de las superficies de la piel.

Sin embargo, los extractos de *Ficus* tradicionales no solubles en agua que se han extraído utilizando disolventes pueden presentar dificultades de formulación, tales como separación de fases, sedimentación, cristalización y falta de uniformidad de concentración de principio activo en toda la composición de base acuosa. Con el fin de superar los problemas de formulación asociados con principios activos no solubles en agua, normalmente se utilizan formulaciones más complejas, tales como emulsiones (que normalmente introducen materiales oleaginosos y/o de sensación aceitosa en las composiciones). Esto lleva a composiciones que dan una sensación grasienta, densa y/o pegajosa en la piel, composiciones que no se eliminan tan fácilmente de la superficie de la piel y procesos de producción más costosos y/o complejos. En muchos casos, estas formulaciones pueden también obstaculizar el suministro del principio activo a la piel.

Sin embargo, dado que la FSF es totalmente soluble en agua, puede incorporarse a formulaciones de base acuosa sin los problemas arriba mencionados asociados a los extractos de *Ficus* tradicionales no solubles en agua. Esto lleva a una mayor flexibilidad de formulación, permitiendo así el suministro de composiciones de *Ficus* con los mejores atributos deseados por los consumidores.

Además, dado que la FSF es totalmente soluble en agua, presenta una mayor biodisponibilidad que los productos extraídos con disolventes que no son totalmente solubles en agua. Esto hace más eficaz el suministro de componentes activos de la FSF a la piel.

Además, debido a su insolubilidad en agua, no es posible medir muchas de las actividades biológicas potenciales de los productos extraídos con disolventes tradicionales. Por ejemplo, en el presente estudio no fue posible medir los valores IC₅₀ de productos extraídos con disolventes, dado que no eran solubles en agua.

Seguridad / alergenicidad

La FSF también está esencialmente libre de feoforbidos y proteínas, materiales que se encuentran comúnmente en las plantas, incluyendo *Ficus*. Se sabe que estos materiales presentan problemas de seguridad, tales como toxicidad y/o reacciones alérgicas en individuos sensibles. En los niveles que normalmente se encuentran en las plantas, estos materiales no suelen ser motivo de preocupación. Sin embargo, cuando los materiales vegetales se concentran, por ejemplo por un procesamiento, la concentración relativa presente aumenta radicalmente y puede crear problemas de seguridad. Por consiguiente, se prefieren en gran medida las composiciones que no contienen estos materiales.

Los feoforbidos son compuestos pigmentarios que son productos de degradación de la clorofila. Además de causar descoloración, se sabe que estos pigmentos son también toxinas biológicas, así como fotosensibilizadores de la piel (Bergstrom, L.C., Vucenik, I., Hagen, I.k., Chernomorsky S.A., Poretz R.D. In-vitro photocytotoxicity of lysosomatropic immunoliposomes containing pheophorbide a with human bladder carcinoma cells. - J. Photochem. Photobiol., 24, 1, 17 - 23, 1994); (Kato T., Yamada K. Relationship between appearance of photosensitization and total pheophorbide level in spirulina powder. - J. Food Hyg. Soc. Japan, 36, 632 - 634, 1995).

Como se muestra en la Figura 2, el extracto de *Ficus* tradicional (del Ejemplo 3) contiene compuestos de elución tardía (es decir más hidrófobos), que no se detectan en la FSF (del Ejemplo 1). Como se muestra en la Figura 3, un cromatograma CL/UV de los compuestos de elución tardía del extracto de *Ficus* tradicional y su

cromatograma de iones extraídos correspondiente identificaron estos compuestos como feoforbidos (véase el ejemplo 5).

Las proteínas, incluyendo aquellas en las plantas tales como *Ficus*, pueden causar una dermatitis de contacto por proteínas en individuos sensibles. Poco después de un contacto con el material proteínico causativo, dichos individuos pueden experimentar síntomas como una erupción de tipo urticaria o vesicular en la piel, a menudo acompañada de prurito, escozor y/o picor (V. Janssens, et al., "Protein contact dermatitis: myth or reality?", British Journal of Dermatology 1995; 132: 1-6). Por consiguiente, es muy deseable que los materiales para el cuidado de la piel contengan la menor cantidad de proteínas posible.

La FSF se ensayó en cuanto al contenido total de proteínas (Ejemplo 1, Tabla 3) utilizando el método de Kjeldahl. En la FSF no se detectó ninguna proteína. Tal como se utiliza aquí, "esencialmente libre de proteínas" significa menos de un 1% (entre un 0% y un 1%) de contenido total de proteínas utilizando el método de Kjeldahl. En algunas formas de realización, el contenido de proteínas está entre un 0% y un 1%, en otras entre un 0% y un 0,5% y en otras entre un 0% y un 0,25% de la FSF.

Color / estabilidad cromática

La FSF tiene un color más claro que los extractos de *Ficus* tradicionales. La FSF tiene un valor de color Gardner de menos de 8, y en algunas formas de realización menos de 7,5. Algunas formas de realización concretas tienen un valor de color Gardner de 5 a 8, en otras de 6 a 8 y en otras de 6,5 a 8. La Figura 8 muestra la diferencia de color de la FSF en relación con la de un extracto de *Ficus* de hoja seca en un estudio de envejecimiento acelerado de 14 días. La Figura 10 muestra la diferencia de color de FSF al 0,55% en un vehículo que tiene distintos niveles de estabilizante/conservante. La Figura 9 es el gráfico de calibrado construido para el análisis del estudio de envejecimiento acelerado de la Figura 8.

Los presentes investigadores han identificado varios componentes de interés en el extracto tradicional, que no están presentes y/o que están presentes en niveles mucho menores en la FSF, que podrían explicar las diferencias de color y de estabilidad cromática entre éstos. Por ejemplo, la Figura 4 muestra que el extracto tradicional contiene mayores cantidades de lo que probablemente sean glucósidos de flavonol. Los glucósidos de flavonol pueden combinarse con taninos (que se hallan tanto en la FSF como en el extracto tradicional) para formar pigmentos poliméricos. Por tanto, el mayor nivel de glucósidos de flavonol podría llevar a la formación de mayores niveles de compuestos pigmentarios en el extracto tradicional. Además, la estructura polifenólica de los flavonoides y los taninos los vuelve bastante sensibles a factores tales como oxidación, calor y luz, lo que puede explicar potencialmente la presencia incrementada de pigmentos en el extracto tradicional con el paso del tiempo.

Contenido de sólidos

Los sólidos contienen la parte biológicamente activa de la FSF o de los extractos. Así, cuanto mayor es el contenido de sólidos, mayor es la actividad botánica. La FSF tiene un contenido de sólidos mayor que los extractos de *Ficus* solubles en agua tradicionales. La FSF tiene un contenido de sólidos (materia seca) de más de un 5% en peso, y en formas de realización concretas de un 5% a un 20%, o de un 5% a un 10%, en peso de la FSF.

Bioactividad de la FSF

La FSF muestra al menos cuatro mecanismos de acción diferentes reconocidos para regular la producción de pigmentación en la piel. Estos mecanismos son la inhibición de la tirosinasa, la inhibición de la tripsina, la inhibición de la COX-2 y la actividad antioxidante. En una forma de realización, la FSF tiene al menos una de las siguientes actividades de reducción de la pigmentación, en otras al menos dos y, como alternativa, al menos 3 de las siguientes actividades de reducción de la pigmentación: inhibición de la tirosinasa C150 (%MS) de 0,003 a 0,06; inhibición de la tripsina C150 (%MS) de 0,02 a 0,5; inhibición de la COX-2 C150 (%MS) de 0,02 a 1; y capacidad antioxidante de barrido de superóxido medida mediante un ensayo DPPH (1/x MS) de 1 a 15 y/o medida mediante un ensayo CARO (1/x MS) de 0,2 a 5. Tal como se utilizan aquí, "MS" es materia seca ("sólidos"), "CARO" es capacidad de absorción de radicales de oxígeno y "DPPH" es una medida de la capacidad de barrido de radicales libres.

Además, como queda demostrado por el ensayo de supresión de melanina B16 del Ejemplo 6, la FSF es más eficaz a la hora de suprimir la producción de melanina que el producto de hoja seca de *Ficus* extraído con disolventes tradicional. Por ejemplo, en una concentración de 0,01, la FSF tuvo como resultado un grado de inhibición de síntesis de la melanina (48,1% de inhibición de la melanina) de más del doble que el del extracto tradicional (23% de inhibición de la melanina).

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para regular la melanogénesis (es decir supresión de la melanina) en la piel. Se cree que diversas formas de hiperpigmentación (por ejemplo pecas, manchas de envejecimiento, manchas hepáticas, máculas cutáneas, pigmentación moteada y similares) que implican una concentración de melanina en la piel son el resultado de cambios en los melanocitos y los queratinocitos presentes en la epidermis. Los melanocitos, que se hallan en la base de la epidermis, pierden su proceso de regulación normal con el aumento de la edad y producen un exceso de pigmento. Este exceso

de producción lleva a la formación de grupos perinucleares densos de melanina en los queratinocitos dentro de la epidermis, lo que tiene como resultado áreas de hiperpigmentación.

5 La terapia tradicional para la piel hiperpigmentada incluye la aplicación de ciertos agentes de aclaramiento de la piel que inhiben la formación de melanina. Un mecanismo de acción para estos materiales propuesto en la técnica es la inhibición de la tirosinasa y/o la inhibición de otras etapas en la síntesis de melanina. La tirosinasa está presente dentro de los melanosomas en los melanocitos epidérmicos y cataliza la etapa comprometida en la formación de melanina a partir de tirosina (véase Goldsmith, L. A., *PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY, AND MOLECULAR BIOLOGY OF THE SKIN*, Oxford University Press, pp. 873-903, N.Y. 1991). La tirosinasa cataliza la hidroxilación de la tirosina y la oxidación de DOPA en DOPAquinina. Así, el enlace de un inhibidor al sitio activo de la tirosinasa tiene como resultado una menor formación de melanina. Véase en general Prota, G. *Melanins and Melanogenesis*, Academic Press, Inc., (San Diego 1992).

10 En las etapas no enzimáticas de la producción de melanina están implicados otros procesos oxidativos. La conversión de DOPAquinona en melanina se produce a través de reacciones químicas no enzimáticas o espontáneas, algunas de las cuales implican especies de oxígeno reactivo (EOR) o radicales de oxígeno. El estrés oxidativo en melanocitos, por ejemplo por estimulación de especies de oxígeno reactivo/radicales de oxígeno (por ejemplo que pueden producirse con una exposición a UV o luz solar), tiene como resultado el inicio de la vía de producción de melanina dentro de los melanocitos. Para ayudar a alterar estos procesos y lograr así beneficios de aclaramiento de la piel se han utilizado diversos antioxidantes/barredores de radicales libres.

20 Se sabe que los metabolitos derivados del ácido araquidónico sirven de potentes mediadores inflamatorios en la piel, particularmente en respuesta a ataques medioambientales, tales como UV, smog y otros irritantes de este tipo. En esta vía, los fosfolípidos de la membrana son convertidos en ácido araquidónico (AA) por la fosfolipasa A2. Una vez formado, el AA es utilizado por una de dos vías biológicas competidoras; bien la vía de la ciclooxigenasa (COX), bien la vía de la 5-lipoxigenasa. La enzima más relevante en la vía inflamatoria de la COX es la COX-2, que cataliza la conversión del ácido araquidónico en PGH₂, una molécula transitoria que se convierte rápidamente en prostaglandinas tales como PGE₂. Las prostaglandinas son autocrinas o paracrinas que actúan como mensajeros locales responsables de provocar una respuesta inflamatoria en el lugar de estimulación.

30 La absorción de la fracción de suero de *Ficus* en la piel inhibe la COX-2, impidiendo que los metabolitos derivados del ácido araquidónico se conviertan en prostaglandinas. El efecto neto es una reducción de las reservas de prostaglandina, tanto basales como inducidas. Una reducción de los niveles de prostaglandina lleva tanto a una reducción directa de la respuesta inflamatoria como a una reducción de todas las actividades de mensajero aguas abajo resultantes. Dos de estas actividades de mensajero incluyen la activación de la síntesis de melanina en los melanocitos y la inhibición de la producción de colágeno en los fibroblastos.

35 Se sabe que las prostaglandinas estimulan los melanocitos aumentando la cantidad de tirosinasa, una enzima responsable de la producción de melanina. La estimulación de los melanocitos y la sobreproducción de melanina lleva a una hiperpigmentación, que se observa como oscurecimiento de un área de la piel. Por tanto, las descoloraciones causadas por inflamación, denominadas hiperpigmentación postinflamatoria, son resultado de la estimulación directa de prostaglandinas en melanocitos. Una reducción de la producción de prostaglandinas, causada por la inhibición de la COX2 de la fracción de suero de *Ficus*, tendría como resultado una menor producción de melanina y un tono de la piel más uniforme.

40 Se ha demostrado que la prostaglandina PGE₂ tiene un efecto significativo a la hora de reducir la síntesis de colágeno de tipo I y/o tipo III en diversas células, incluyendo fibroblastos dérmicos humanos, células mesangiales de rata y células estrelladas hepáticas [refs]. Dado que los tipos I y III son formas predominantes de colágeno que componen la dermis de la piel, esto confirma que unos niveles elevados de PGE₂ en respuesta a una inflamación llevarían a la inhibición de la síntesis de colágeno. Se ha demostrado que el AA y la PGE₂ tienen un efecto inhibitorio en la síntesis de colágeno. La adición de inhibidores de la COX-2 derivados de fuentes naturales, incluyendo los ácidos grasos omega-3 EPA y DHA, pudo contrarrestar la inhibición de la síntesis de colágeno causada por la PGE₂, llevando a un aumento neto de la síntesis de colágeno. Por tanto, la fracción de suero de *Ficus* mejora probablemente la textura de la piel inhibiendo la COX-2, lo que reduce la formación de las prostaglandinas que causan la inhibición del colágeno.

45 Se ha descubierto inesperadamente que la fracción de suero de *Ficus* logra efectos de aclaramiento de la piel superiores a los del extracto de *Ficus* tradicional, incluyendo el aclaramiento de zonas hiperpigmentadas en la piel de los mamíferos, cuando se aplica tópicamente en la piel. Además, los ensayos analíticos han demostrado que la fracción de suero de *Ficus* de la presente invención altera la síntesis de melanina por múltiples mecanismos de acción, que afectan tanto a la vía enzimática como a la no enzimática. La FSF tiene una bioactividad mejorada en comparación con el extracto de *Ficus* tradicional, incluyendo una actividad de inhibición enzimática o una combinación de actividades de inhibición enzimática, una actividad de barrido de radicales libres, una actividad antioxidante y una actividad inhibitoria de la síntesis de melanina. Entre las actividades de inhibición enzimática se incluyen, de forma no exclusiva, una de las siguientes o una combinación de las siguientes: actividad de inhibición de tirosinasa, actividad de inhibición de elastasa,

actividad de inhibición de tripsina y actividad de inhibición de ciclooxigenasa-2 ("COX-2"). La actividad antioxidante incluye, de forma no exclusiva, una capacidad de absorción de radicales de oxígeno.

5 Aunque los presentes investigadores han demostrado también por medio de un ejemplo que los extractos de *Ficus* tradicionales pueden proporcionar beneficios en cuanto a la hiperpigmentación, estos extractos tradicionales no son tan eficaces y tienen propiedades que los hacen menos adecuados y, por tanto, menos deseables para el uso en composiciones cosméticas.

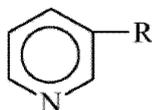
10 Como queda demostrado en la Figura 5, la FSF tiene niveles mayores (aproximadamente 10x) de catequina y taninos condensados relacionados. Los taninos condensados (proantocianidinas), como las catequinas, son una clase de flavonoles. Las proantocianidinas son esencialmente cadenas poliméricas de flavonoides, tales como las catequinas. Se cree que los taninos actúan de antioxidantes biológicos (barredores de radicales libres) en el cuerpo humano y se cree de forma generalizada que son eficaces a la hora de combatir el daño oxidativo en la piel, causado por ejemplo por el envejecimiento. Además, los antioxidantes pueden ayudar a proteger contra los efectos de estreses internos y medioambientales, tales como la polución y fumar cigarrillos, y apoyan procesos metabólicos normales del cuerpo (Kehrer, J.P. Crit. Rev. Toxicol. 1993, 23, 21). La Figura 7 demuestra también que la FSF contenía mayores niveles de tirosina, fenilalanina y triptófano libres, que son aminoácidos esenciales. Sin embargo, los niveles de los tres isómeros del ácido cafeoilquinico detectados no parecían ser sustancialmente diferentes entre las dos muestras, como queda demostrado en la Figura 6.

B. Agente de tono de piel

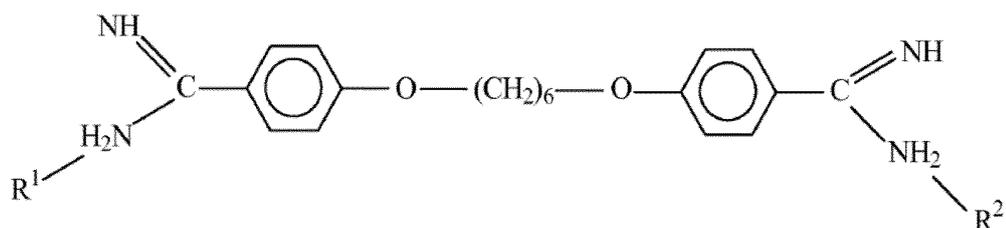
20 En algunas realizaciones puede ser deseable incluir un agente de tono de piel en la composición en combinación con la FSF. Los agentes de tono de piel se pueden incluir para mejorar aún más el tono general de la piel. Cuando está presente, las composiciones de la presente invención contienen hasta aproximadamente un 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 3% en peso con respecto a la composición del agente de tono de piel. Cuando está presente, las composiciones de la presente invención contienen al menos aproximadamente un 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,2%, 0,5% o 1% en peso con respecto a la composición del agente de tono de piel. Entre los intervalos adecuados se incluye cualquier combinación de los límites inferiores y superiores, incluyendo intervalos adecuados entre de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 50%; de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 20%; o de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10% en peso con respecto a la composición del agente de tono de piel. Las cantidades que aquí se citan solo han de ser utilizadas como una guía, dado que la cantidad óptima del agente de tono de piel dependerá del principio activo específico seleccionado, ya que su potencia varía considerablemente.

35 Entre los agentes de tono de piel adecuados se incluyen, de forma no exclusiva, aminos de azúcar, compuestos de vitamina B3, arbutina, desoxiarbutina, 1-3-dihidroxi-4-alquilbenceno como hexilresorcinol, dilaurato de sacarosa, bakuchiol (4-[(1E,3S)-3-etenil-3,7-dimetil-1,6-octadienil] fenol o monoterpeno fenol), pirenoína (disponible en Biotech Marine, Francia), extracto de semillas de *panicum miliaceum*, ácido dioico arlatone, ácido cinámico, ácido ferúlico, achromaxyl, metilnicotinamida, extracto de regaliz soluble en aceite, ácido fólico, ácido undecilénico (es decir, ácido undecenoico), undecilenato de zinc, tiamina (vitamina B1) y su clorhidrato, L-triptófano, extracto de hoja de *helianthus annuus* (girasol) y de *vitis vinifera* (uva), carnosina (es decir, dragosina), gentisato de metilo, 1,2-hexanodiol y 1,2-octanodiol (es decir, combinación vendida como Symdiol 68 por Symrise AG, Alemania), inositol, decilenoilfenilalanina (por ejemplo vendida bajo el nombre comercial Sepiwhite por Seppic, Francia), ácido kójico, compuestos de hexamidina, ácido salicílico y retinoides, incluyendo retinol y propionato de retinilo.

40 En determinadas formas de realización, el agente de tono de piel adicional se selecciona de entre compuestos de vitamina B3, aminos de azúcar, compuestos de hexamidina, ácido salicílico, 1,3-dihidroxi-4-alquilbenceno como hexilresorcinol, y retinoides. Tal como se utiliza aquí, "compuesto de vitamina B₃" significa un compuesto de fórmula:



45 donde R es -CONH₂ (es decir, niacinamida), -COOH (es decir, ácido nicotínico), o -CH₂OH (es decir, alcohol nicotínico); derivados de los mismos; y sales de cualquiera de los compuestos anteriores. Tal como se utiliza aquí, el concepto "amina de azúcar" incluye isómeros y tautómeros de éstos y sus sales (por ejemplo sal HCl) y sus derivados. Entre los ejemplos de aminos de azúcar se incluyen glucosamina, N-acetilglucosamina, manosamina, N-acetilmanosamina, galactosamina, N-acetilgalactosamina, sus isómeros (por ejemplo estereoisómeros) y sus sales (por ejemplo sal HCl). Tal como se utiliza aquí, el concepto "compuesto de hexaminida" significa un compuesto de fórmula:



donde R¹ y R² son opcionales o son ácidos orgánicos (por ejemplo ácidos sulfónicos, etc.). En una forma de realización, el compuesto de hexamidina es diisetonato de hexamidina.

C. Agentes antiinflamatorios

- 5 La hiperpigmentación se puede deber a una inflamación de la piel. Entre los procesos inflamatorios transitorios que provocan hiperpigmentación y, más específicamente hiperpigmentación postinflamatoria, se incluyen, de forma no exclusiva, lesiones por acné, pelos encarnados, arañazos, picaduras de insectos, daños por agentes tensioactivos, alérgenos y exposición a UV de corta duración. La hiperpigmentación inducida por inflamación, incluyendo la hiperpigmentación postinflamatoria, se puede tratar incorporando en las composiciones de la presente invención un agente antiinflamatorio. Cuando está presente, las composiciones de la presente invención contienen hasta aproximadamente un 20%, 10%, 5%, 3% o 1% en peso con respecto a la composición del agente antiinflamatorio. Cuando está presente, las composiciones de la presente invención contienen al menos aproximadamente un 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5% o 1% en peso con respecto a la composición del agente antiinflamatorio. Entre los intervalos adecuados se incluye cualquier combinación de los límites inferiores y superiores. Entre los agentes antiinflamatorios adecuados se incluyen, de forma no exclusiva, agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE, incluyendo, de forma no exclusiva, ibuprofeno, naproxeno, ácido flufenámico, etofenamato, aspirina, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, piroxicam y felbinaco), ácido glicirricico (también conocido como glicirricina, ácido glicirixínico y ácido glicirretínico glucósido) y sales tales como glicirrizato dipotásico, ácido glicirreténico, extractos de regaliz, bisabolol (por ejemplo, alfa bisabolol), manjistha (extraída de plantas del género *Rubia*, en particular *Rubia cordifolia*) y guggul (extraído de plantas del género *Commiphora*, en particular *Commiphora mukul*), extracto de kola, manzanilla, extracto de trébol rojo y extracto de gorgonácea (extractos de plantas del orden *Gorgonaceae*), derivados de cualquiera de los anteriores, y mezclas de los mismos.

D. Principios activos protectores solares

- 25 Las composiciones de la presente invención pueden comprender uno o más principios activos protectores solares (o agentes protectores solares) y/o absorbentes de luz ultravioleta. En este contexto, el concepto "principio activo protector solar" incluye colectivamente principios activos protectores solares, agentes protectores solares y/o absorbentes de luz ultravioleta. Entre los principios activos protectores solares se incluyen tanto agentes protectores solares como filtros solares físicos. Los principios activos protectores solares pueden ser orgánicos o inorgánicos. En Personal Care Product Council's International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, Decimotercera Edición, se describen como "sunscreen agents" ejemplos de principios activos protectores solares adecuados. Principios activos protectores solares particularmente adecuados son 2-etilhexil-p-metoxicinamato (comercialmente disponible como PARSOL™ MCX), 4,4'-t-butilmetoxidibenzoil-metano (comercialmente disponible como PARSOL™ 1789), 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, ácido octildimetil-p-aminobenzoico, digaloioltrioleato, 2,2-dihidroxi-4-metoxibenzofenona, etil-4-(bis(hidroxiopropil))aminobenzoato, 2-etilhexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato, 2-etilhexil-salicilato, gliceril-p-aminobenzoato, 3,3,5-tri-metilciclohexilsalicilato, mentilntranilato, ácido p-dimetilaminobenzoico o aminobenzoato, 2-etilhexil-p-dimetil-amino-benzoato, ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfónico, ácido 2-(p-dimetilaminofenil)-5-sulfónico-benzoxazoico, octocrileno, óxido de zinc, bencilideno alcanfor y derivados de los mismos, dióxido de titanio, y mezclas de los mismos.

- En una forma de realización, la composición puede comprender entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 20%, y como alternativa entre aproximadamente un 2% y aproximadamente un 10%, en peso con respecto a la composición del principio activo protector solar. Las cantidades exactas variarán dependiendo del principio activo protector solar elegido y del factor de protección solar (FPS) deseado, lo que entra dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

E. Componentes opcionales

- Las composiciones de la presente invención pueden contener otros ingredientes diversos siempre que no alteren de forma inaceptable las ventajas de la invención. Cuando están presentes, las composiciones de la presente invención pueden contener entre aproximadamente un 0,001% y aproximadamente un 50%; entre aproximadamente un 0,001% y aproximadamente un 20%; o, como alternativa, entre aproximadamente un 0,01% y aproximadamente un 10%, en peso con respecto a la composición, de los componentes opcionales. Las cantidades que aquí se citan solo han de ser utilizadas como una guía, dado que la cantidad óptima de los componentes opcionales utilizados en una composición dependerá del principio activo específico seleccionado,

ya que su potencia varía considerablemente. Por tanto, la cantidad de algunos componentes opcionales útiles en la presente invención puede estar fuera de los intervalos aquí enumerados.

5 Los componentes opcionales, cuando se incorporan en la composición, deben ser adecuados para su uso en contacto con tejido de la piel humana sin una excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares. Las composiciones de la presente invención pueden incluir componentes opcionales tales como principios activos antiacné, principios activos de descamación, agentes anticelulíticos, agentes quelantes, flavonoides, principios activos bronceadores, antioxidantes no vitamínicos y barredores de radicales libres, reguladores del crecimiento del pelo, principios activos antiarrugas, principios activos antiatrofia, minerales, fitosteroles y/o hormonas vegetales, compuestos de N-acilaminoácidos, principios activos antimicrobianos o antifúngicos y otros principios activos útiles para el cuidado de la piel, que se describen de forma más detallada en las publicaciones de solicitud de US2006/0275237A1 y US2004/0175347A1.

10 El Personal Care Product Council's *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, Decimotercera Edición, describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos no limitativos usados comúnmente en la industria del cuidado de la piel, que son componentes opcionales adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención. Entre los ejemplos de estas clases de ingredientes se incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos como fragancias, pigmentos, colorantes, aceites esenciales, agentes antiaglomerantes, agentes antiespumantes, antimicrobianos, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tampón, agentes de carga, agentes quelantes, aditivos químicos, colorantes, astringentes cosméticos, biocidas cosméticos, desnaturalizantes, astringentes de fármacos, emolientes, analgésicos externos, agentes o materiales filmógenos, agentes opacificantes, reguladores del pH, conservantes, propelentes, agentes reductores, agentes secuestrantes, agentes refrescantes para la piel, protectores cutáneos, modificadores de viscosidad espesantes, vitaminas y combinaciones de los mismos.

F. Vehículo dermatológicamente aceptable

25 Las composiciones de la presente invención también pueden comprender un vehículo dermatológicamente aceptable (que se puede denominar "vehículo") para la composición. Tal como se utiliza aquí, la expresión "vehículo dermatológicamente aceptable" significa que el vehículo es adecuado para la aplicación tópica en el tejido queratinoso, tiene buenas propiedades estéticas, es compatible con los principios activos de la composición y no provocará excesivos problemas de seguridad o toxicidad. En una forma de realización, el vehículo está presente en una cantidad entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 99%, entre 30 aproximadamente el 60% y aproximadamente el 98%, entre aproximadamente el 70% y aproximadamente el 98% o, como alternativa, entre aproximadamente el 80% y aproximadamente el 95% en peso con respecto a la composición.

35 El vehículo se puede encontrar en una amplia variedad de formas. Entre algunos ejemplos no limitativos se incluyen soluciones simples (por ejemplo acuosas, basadas en disolvente orgánico o basadas en aceite), emulsiones y formas sólidas (por ejemplo geles, barras, sólidos fluidos o materiales amorfos). En determinadas formas de realización, el vehículo dermatológicamente aceptable está en forma de emulsión. La emulsión se puede clasificar en general como una emulsión con una fase acuosa continua (por ejemplo de aceite en agua y de agua en aceite en agua) o una fase oleosa continua (por ejemplo de agua en aceite y de aceite en agua en aceite). La fase oleosa de la presente invención puede comprender aceites de silicona, aceites no silicónicos 40 tales como aceites de hidrocarburo, ésteres, éteres y similares, y mezclas de los mismos.

45 La fase acuosa comprende normalmente agua. Sin embargo, en otras formas de realización, la fase acuosa puede comprender componentes diferentes del agua, incluyendo, de forma no exclusiva, agentes humectantes solubles en agua, agentes acondicionadores, antimicrobianos, humectantes y/o principios activos para el cuidado de la piel solubles en agua. En una forma de realización, el componente no acuoso de la composición comprende un humectante tal como glicerina y/u otros polioles. No obstante, se ha de admitir que la composición puede ser fundamentalmente (es decir, menos de un 1% de agua) o totalmente anhidra.

50 Se selecciona el vehículo adecuado para obtener una forma de producto deseada. Además, la solubilidad o dispersabilidad de los componentes (por ejemplo FSF, principios activos protectores solares, componentes adicionales) puede imponer la forma y el carácter del vehículo. En una forma de realización es preferible una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite.

55 Las emulsiones pueden comprender además un emulsionante. La composición puede comprender cualquier porcentaje adecuado de emulsionante para emulsionar suficientemente el vehículo. Los intervalos en peso adecuados incluyen entre aproximadamente un 0,1% y aproximadamente un 10%, o entre aproximadamente un 0,2% y aproximadamente un 5% de un emulsionante, basado en el peso de la composición. Los emulsionantes pueden ser no iónicos, aniónicos o catiónicos. Por ejemplo, en la Patente US 3.755.560, US 4.421.769, y en McCutcheon's Detergents and Emulsifiers, Edición Norteamericana, páginas 317-324 (1986) se dan a conocer emulsionantes adecuados. Las emulsiones adecuadas pueden tener una amplia gama de viscosidades, dependiendo de la forma de producto deseada.

60 El vehículo también puede comprender un agente espesante tal como es conocido en la técnica para obtener composiciones con una viscosidad y un carácter reológico adecuados.

G. Ejemplos de composiciones

Los siguientes son ejemplos no limitativos de las composiciones de la presente invención. Los ejemplos se dan únicamente con fines ilustrativos y no deben ser interpretados como limitativos de la presente invención, ya que son posibles muchas variaciones de los mismos sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención, que serían reconocidas por los expertos en la técnica. En los ejemplos, todas las concentraciones están indicadas como porcentajes en peso, a no ser que se especifique otra cosa, y pueden excluir materiales secundarios tales como diluyentes, cargas, etc. Por tanto, las formulaciones citadas comprenden los componentes que aparecen en las listas y todo material secundario asociado a dichos componentes. Como es evidente para el experto en la técnica, la selección de estos materiales secundarios variará dependiendo de las características físicas y químicas de los ingredientes particulares seleccionados para realizar la presente invención tal como se describe aquí.

Todos los ejemplos pueden emplearse para tratar o mejorar el aspecto de una o más manchas hiperpigmentadas. La presente invención se puede referir también a un régimen que implica el tratamiento localizado de una o más manchas hiperpigmentadas mediante una primera composición (por ejemplo los Ejemplos A o B) y un tratamiento de la piel facial más amplio o general mediante una segunda composición (por ejemplo los Ejemplos C, D o E), que se puede aplicar antes o después del tratamiento localizado para mejorar el tono de piel de toda la cara.

Componente	Ej. A	Ej. B	Ej. C	Ej. D	Ej. E
Fracción de suero de <i>Ficus</i>	0,55	1,000	1,000	1,000	1,000
N-acetilglucosamina	0	0	2,000	0	0
Diisetionato de hexamidina	0			0,090	0,090
Undecilenoilfenilalanina *2 (neutralizada)	0	1,000	0,500	0	0
Glicirrizato dipotásico	0	0,300	0,100	0,100	0,100
Niacinamida	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Isohexadecano	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Isostearato de isopropilo	1,330	1,330	1,330	1,330	1,330
Polialgdonato de sacarosa	0,670	0,670	0,670	0,670	0,670
Polimetilsilsesquioxano	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
Glucósido de cetearilo + alcohol cetearílico *3	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Alcohol behenílico	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400
Alcohol cetílico	0,320	0,320	0,320	0,320	0,320
Alcohol estearílico	0,480	0,480	0,480	0,480	0,480
Acetato de tocoferilo	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
PEG-100 estearato	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Glicerina	7,000	7,000	7,000	7,000	7,000
Dióxido de titanio	0,604	0,604	0,604	0,604	0,604
Poliacrilamida + C13-14 isoparafina + laureth-7 *4	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Alantoína	0,200	0,200	0,200	0	0
Pantenol	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
EDTA disódico	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Alcohol bencílico	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400
Dimeticona / dimeticonol *5	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Homosalato	0	0	0	0	9,000
Avobenzona	0	0	0	0	3,000
Octocrileno	0	0	0	0	2,600
Oxibenzona	0	0	0	0	1,000
Octisalato	0	0	0	0	4,500
Agua	QS	QS	QS	QS	QS
TOTAL	100	100	100	100	100

*1 - Producido por Integrated Botanical Technologies, Nueva York.
 *2 - Sepiwhite disponible en SEPPIC, Francia.
 *3 - Emulgade PL 68/50 disponible en Cognis GmbH.
 *4 - Sepigel 305, disponible en SEPPIC, Francia.
 *5 - Dow Corning DC1503 disponible en Dow Corning, Inc., Midland, MI.

Las composiciones de la presente invención se preparan generalmente mediante métodos convencionales tal como se conocen en la técnica de fabricación de composiciones tópicas. Estos métodos normalmente incluyen la mezcla de los ingredientes en uno o más pasos hasta un estado relativamente uniforme, con o sin calentamiento, enfriamiento, aplicación de vacío y similares. Normalmente, las emulsiones se preparan

- mezclando primero los materiales en fase acuosa por separado de los materiales en fase oleosa y combinando después las dos fases del modo apropiado para obtener la fase continua deseada. Las composiciones se preparan preferiblemente de modo que se optimice la estabilidad (estabilidad física, estabilidad química, fotoestabilidad) y/o el suministro de los materiales activos. Esta optimización puede incluir un pH apropiado (por ejemplo inferior a 7), la exclusión de materiales que pueden formar complejos con el agente activo y por ello influir negativamente en la estabilidad o el suministro (por ejemplo, exclusión de hierro contaminante), el uso de estrategias para prevenir la formación de complejos (por ejemplo agentes dispersantes apropiados o envasado en compartimentos dobles), el uso de estrategias de fotoestabilidad apropiadas (por ejemplo incorporación de protector solar/filtro solar, uso de envases opacos), etc.
- 10 Las composiciones de esta invención contienen preferiblemente desde o aproximadamente un 0,01% hasta o aproximadamente un 10% de fracción de suero de *Ficus*, más preferiblemente desde o aproximadamente un 0,05% hasta o aproximadamente un 5%, más preferiblemente desde o aproximadamente un 0,1% hasta o aproximadamente un 5%, por ejemplo un 2%, de fracción de suero de *Ficus*.

H. Métodos para aclarar la piel

- 15 Las composiciones de la presente invención son útiles para aclarar piel de mamífero (especialmente piel humana, más especialmente piel facial y piel de las manos). Las composiciones son especialmente útiles para aclarar zonas hiperpigmentadas de la piel.

20 El método para aclarar la piel (incluyendo zonas hiperpigmentadas) implica aplicar tópicamente en la piel una cantidad segura y eficaz de una composición de la presente invención. En una forma de realización, las composiciones cosméticas de esta invención pueden comprender desde un 0,01% hasta un 10% de fracción de suero de *Ficus*. La cantidad aplicada de la composición, la frecuencia de aplicación y el periodo de uso variarán ampliamente dependiendo del nivel de fracción de suero de *Ficus* y/o de otros componentes de una composición dada y del nivel de aclaramiento deseado, por ejemplo a la luz del nivel de la pigmentación de la piel presente en el sujeto y la velocidad de una pigmentación posterior de la piel.

- 25 En una forma de realización preferida, la composición se aplica de forma crónica en la piel. Con "aplicación tópica crónica" quiere decirse una aplicación tópica esencialmente continua de la composición durante un periodo prolongado a lo largo de la vida del sujeto, preferiblemente durante un periodo de al menos aproximadamente una semana, más preferiblemente durante un periodo de al menos aproximadamente un mes, aún más preferiblemente durante al menos aproximadamente tres meses, aún más preferiblemente durante al menos aproximadamente seis meses y aún más preferiblemente durante al menos aproximadamente un año. Aunque pueden obtenerse beneficios después de diversos periodos máximos de uso (por ejemplo, dos, cinco, diez o veinte años), se prefiere que la aplicación crónica continúe a lo largo de toda la vida del sujeto. Normalmente, las aplicaciones serían del orden de aproximadamente una o dos veces al día durante tales periodos prolongados, pero las frecuencias de aplicación pueden variar, por ejemplo desde aproximadamente una vez a la semana hasta aproximadamente tres veces al día o más.

Para obtener un beneficio de aclaramiento de la piel puede emplearse una amplia gama de cantidades de las composiciones de la presente invención. Las cantidades de las presentes composiciones que normalmente se aplican en cada aplicación van desde aproximadamente 0,1 mg/cm² de piel hasta aproximadamente 10 mg/cm² de piel. Una cantidad de aplicación particularmente útil es de aproximadamente 2 mg/cm² de piel.

- 40 El concepto "aplicación tópica", tal como se utiliza aquí, significa aplicar o extender las composiciones de la presente invención sobre la superficie de la piel. Las composiciones de la presente invención preferidas son aquellas con una forma destinada a dejarla en contacto con la piel durante un periodo prolongado (por ejemplo durante varias horas) después de la aplicación tópica, por ejemplo el uso típico de una crema, loción, crema hidratante o similares.

- 45 El método de aclaramiento de la piel se lleva a cabo preferiblemente aplicando tópicamente una composición en forma de una loción, crema, producto cosmético o similar para la piel, previsto para dejarlo sobre la piel para algún beneficio estético, profiláctico, terapéutico o de otro tipo. Después de aplicar la composición en la piel, preferiblemente se deja sobre la piel durante un periodo de al menos aproximadamente 15 minutos, más preferiblemente al menos aproximadamente 30 minutos, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 1 hora y con la máxima preferencia durante al menos varias horas, por ejemplo hasta aproximadamente 12 horas.

- 55 Las composiciones de la presente invención son también útiles para regular el estado de la piel de los mamíferos más en general (especialmente la piel humana, más especialmente la piel facial y/o de las manos), incluyendo signos de envejecimiento de la piel y discontinuidades visibles y/o táctiles en la piel asociadas con el envejecimiento de la piel. Tal regulación incluye una regulación profiláctica y/o terapéutica. La regulación del estado de la piel implica aplicar tópicamente en la piel una cantidad segura y eficaz de una composición de la presente invención. La cantidad aplicada de la composición, la frecuencia de aplicación y el periodo de uso variarán ampliamente dependiendo del nivel de fracción de suero de *Ficus* y/o de otros componentes de una composición dada y del nivel de regulación deseado, por ejemplo a la luz del envejecimiento de la piel presente en el sujeto y la velocidad de un envejecimiento posterior de la piel.
- 60

I. Bioactividad de la fracción de suero de *Ficus*

La invención se refiere también a métodos para reducir la aparición de una hiperpigmentación de la piel aplicando tópicamente la composición cosmética en áreas hiperpigmentadas con el fin de alterar una o más etapas en la melanogénesis (síntesis de melanina). La composición cosmética efectúa una inhibición enzimática (actividad de inhibición de tripsina y/o actividad de inhibición de tirosinasa), actividades antioxidantes (CARO y DPPH) y/o inhibición de la COX-2, alterando de este modo una o más etapas en la melanogénesis.

El método para preparar composiciones cosméticas botánicas bioactivas es ventajoso en comparación con los métodos actualmente disponibles, ya que produce extractos vegetales que capturan todo el espectro de actividad contenido en las células vegetales. Como se muestra en el Ejemplo 6, el extracto de *Ficus* de la presente invención tiene una bioactividad mucho mayor que el *Ficus* extraído por medios tradicionales.

En una forma de realización de la presente invención, el método para aclarar la piel de un mamífero comprende administrar tópicamente una composición cosmética que comprende una cantidad eficaz de fracción de suero de *Ficus* para inhibir la actividad de la tripsina.

Otra forma de realización de la presente invención comprende un método para aclarar la piel de un mamífero inhibiendo la actividad de la tirosinasa en la piel de un mamífero, comprendiendo el método administrar tópicamente a un mamífero una composición cosmética que comprende una cantidad eficaz de fracción de suero de *Ficus*.

El color de la piel normal está formado por la melanina, un pigmento natural que también determina el color del pelo y los ojos. En la piel, la enzima tirosinasa es esencial para la vía bioquímica responsable de la conversión del aminoácido tirosina en melanina. La hiperpigmentación se da cuando se produce demasiada melanina y ésta forma depósitos en la piel. Las células que fabrican el pigmento se denominan melanocitos. Éstos se hallan en la base de la epidermis. Los melanocitos producen melanosomas, que se pasan a otras células de la epidermis y que se abren camino hasta la capa superior de la piel. La síntesis de melanina se produce exclusivamente en melanosomas. Cuando se produce demasiada melanina, se forman depósitos y aparece una hiperpigmentación en la piel.

La tirosinasa es una monooxigenasa que contiene cobre y que cataliza la o-hidroxilación de monofenoles para formar los catecoles correspondientes (actividad de monofenolasa o cresolasa) y la oxidación de monofenoles para formar las o-quinonas correspondientes (actividad de difenolasa o catecolasa). Estas funciones de la tirosinasa desempeñan un importante papel en la formación de pigmentos de melanina durante la melanogénesis. La producción de melanina es la principal responsable del color de la piel y desempeña un importante papel en la prevención de lesiones de la piel causadas por el sol. Sin embargo, una acumulación anormal de productos de melanina en la piel es responsable de hiperpigmentaciones, incluyendo melasma, cloasma, pecas y lentigos seniles, que pueden llevar a un aspecto estético no deseado (Jeon et al. (2005) Bull. Korean Chem. Soc, Vol. 26: 1135-1 137).

La invención se refiere en general a la inhibición de la actividad de al menos una enzima responsable de la pigmentación o la tonalidad de la piel dentro del tejido de la piel de un mamífero. La fracción de suero de *Ficus* puede inhibir la actividad de la tripsina, así como de la tirosinasa y otras enzimas similares a la tirosinasa. Además, la invención se refiere a una actividad antioxidante relacionada con pigmentos (CARO y DPPH), incluyendo una actividad de barrido de superóxido, así como una inhibición de la COX-2.

La composición cosmética derivada del suero tiene una potencia de barrido de superóxido que se halla dentro de un valor CIR50 entre aproximadamente 50 y 190 µg de materia seca/ml. Tal como se utiliza en la presente solicitud, la expresión "valor CIR50" representa la concentración de materia seca contenida en la fracción de suero celular necesaria para inhibir el 50 por ciento de la reducción de citocromo c.

El compuesto puede administrarse a un mamífero con una frecuencia tal como varias veces al día o puede administrarse menos frecuentemente, por ejemplo una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso menos frecuentemente, por ejemplo una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis estará perfectamente clara para el trabajador cualificado y dependerá de un número cualquiera de factores tales como, de forma no exclusiva, el tipo y la gravedad de la enfermedad que se esté tratando, el tipo y la edad del animal, etc.

J. Componentes opcionales

Las composiciones de la presente invención pueden contener otros diversos ingredientes utilizados convencionalmente en determinados tipos de productos, siempre que no alteren de forma inaceptable las ventajas de la invención. La composición puede incluir un vehículo dermatológicamente aceptable.

Los componentes opcionales, cuando se incorporan en la composición, deben ser adecuados para su uso en contacto con tejido de la piel humana sin excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares dentro del alcance del buen juicio. El CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Segunda Edición (1992), describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos no limitativos utilizados comúnmente

- en la industria del cuidado de la piel, que son adecuados para utilizarlos en las composiciones de la presente invención. Entre los ejemplos de estas clases de ingredientes se incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos tales como fragancias, pigmentos, colorantes, aceites esenciales, agentes antiaglomerantes, agentes antiespumantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tampón, agentes de carga, agentes quelantes, aditivos químicos, colorantes, astringentes cosméticos, biocidas cosméticos, desnaturalizantes, astringentes de fármacos, analgésicos externos, agentes o materiales filmógenos, por ejemplo polímeros, para contribuir a las propiedades filmógenas y la afinidad de la composición (por ejemplo, copolímero de eicoseno y vinilpirrolidona), agentes opacificantes, reguladores del pH, propelentes, agentes reductores, agentes secuestrantes y espesantes.
- 5
- 10 En algunas formas de realización puede ser deseable incluir un segundo, tercer o cuarto agente de tono de piel en la composición, en combinación con la FSF. El segundo, el tercer y el cuarto agentes de tono de piel pueden incluirse para mejorar aún más el tono general de la piel. Cuando está presente, las composiciones de la presente invención contienen preferiblemente desde aproximadamente un 0,1% hasta aproximadamente un 50%, más preferiblemente desde aproximadamente un 0,2% hasta aproximadamente un 20%, aún más preferiblemente desde aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 10%, en peso con respecto a la composición, del agente de tono de piel adicional. Las cantidades que aquí se enumeran solo deben emplearse como guía, dado que la cantidad óptima del agente de tono de piel adicional dependerá del principio activo específico seleccionado, ya que su potencia varía considerablemente. Entre los agentes de tono de piel preferidos se incluyen, de forma no exclusiva, N-acetilglucosamina, vitamina B3 y undecilenoilfenilalanina (por ejemplo vendida con el nombre comercial Sepiwhite, Seppic, Francia). En algunas formas de realización, una composición (por ejemplo la composición nº 1 de la Tabla nº 1) puede utilizarse como tratamiento localizado para una o más manchas hiperpigmentadas, mientras que otra u otras composiciones (por ejemplo las composiciones nº 2, nº 3 y nº 4 de la Tabla nº 1) pueden aplicarse antes o después del tratamiento especializado más extensamente en superficies de piel facial para mejorar el tono de piel en toda la cara.
- 15
- 20
- 25 Las composiciones tópicas de la presente invención pueden proporcionarse en diversas formas, incluyendo, de forma no exclusiva, lociones, leches, mousses, sueros, aerosoles, espumas, barras, lápices, geles, cremas y ungüentos. En una forma de realización, la composición está en forma de solución y en otra forma de realización la composición está en forma de loción.

K. Preparación de la composición

- 30 Las composiciones de la presente invención se preparan generalmente mediante métodos convencionales tal como se conocen en la técnica de fabricación de composiciones tópicas. Estos métodos normalmente incluyen la mezcla de los ingredientes en uno o más pasos hasta un estado relativamente uniforme, con o sin calentamiento, enfriamiento, aplicación de vacío y similares. Las composiciones se preparan preferiblemente de modo que se optimice la estabilidad (estabilidad física, estabilidad química, fotoestabilidad) y/o el suministro de los materiales activos. Esta optimización puede incluir un pH apropiado (por ejemplo inferior a 7), la exclusión de materiales que pueden formar complejos con el agente activo y por ello influir negativamente en la estabilidad o el suministro (por ejemplo, exclusión de hierro contaminante), el uso de estrategias para prevenir la formación de complejos (por ejemplo agentes dispersantes apropiados o envasado en compartimentos dobles), el uso de estrategias de fotoestabilidad apropiadas (por ejemplo incorporación de protector solar/filtro solar, uso de envases opacos), etc.
- 35
- 40

L. Métodos de tratamiento

- En una forma de realización, un usuario selecciona una mancha hiperpigmentada para el tratamiento y se aplica una primera composición en la mancha hiperpigmentada al menos una vez al día, y más preferiblemente dos veces al día, durante al menos aproximadamente 4 semanas. En otra forma de realización, la primera composición se aplica en la mancha hiperpigmentada durante un periodo de al menos aproximadamente 8 semanas. La primera composición puede estar en cualquier forma. En una forma de realización, la composición está en forma de una solución que se aplica con un cuentagotas localmente en la mancha hiperpigmentada. Pueden utilizarse otros aplicadores que puedan aplicar la primera composición localmente en la mancha hiperpigmentada. Por ejemplo, para aplicar la composición en la mancha hiperpigmentada puede utilizarse un aplicador con punta de espuma o de algodón que retenga, de manera que pueda liberarla, una primera composición tal como una solución, una loción o cualquier otra forma aquí descrita. En otra forma de realización, la composición se aplica en la o las manchas hiperpigmentadas y de forma más general simultáneamente en una o más superficies de la piel facial (es decir dentro del mismo ciclo de tratamiento).
- 45
- 50
- 55 En algunos casos, el método de tratamiento comprende seleccionar una pluralidad de manchas hiperpigmentadas para un tratamiento localizado mediante la primera composición en un ciclo de tratamiento. Tal como se utiliza aquí, un ciclo de tratamiento se refiere a una aplicación individual de una composición en la superficie de la piel prevista. Por ejemplo, una aplicación individual de la primera composición en una o más manchas hiperpigmentadas en una sucesión razonablemente corta (por ejemplo a lo largo de un periodo de 1 a 30 minutos) constituiría un ciclo de tratamiento individual. En cambio, una aplicación individual de la primera composición en una o más manchas hiperpigmentadas dos veces al día constituye dos ciclos de tratamiento,
- 60

estando las aplicaciones separadas una de otra un espacio de tiempo más largo (por ejemplo separadas de 1 a 12 horas).

5 En una forma de realización, el método de tratamiento comprende la aplicación de una primera composición en combinación con una segunda composición, que se aplica antes o después de la primera composición, aplicándose la segunda composición de forma más general en una o más superficies de la piel facial para mejorar el aspecto de la tonalidad general de la piel facial. La segunda composición puede aplicarse en una o más de las superficies de piel de la frente, periorales, de la barbilla, periorbitarias, de la nariz y de la mejilla. En una forma de realización, la segunda composición se aplica simultáneamente al menos en superficies de piel de la mejilla, la frente y la barbilla/periorales en un ciclo de tratamiento individual. Dada la mayor área de superficie en la que se aplica la segunda composición en comparación con el tratamiento localizado de la mancha hiperpigmentada.

15 Aunque algunos métodos aquí descritos contemplan la aplicación de las composiciones de la presente invención con un aplicador, se ha de entender que los aplicadores no son necesarios y que las composiciones de la presente invención pueden aplicarse también directamente o utilizando el dedo (o de alguna otra manera). Además, aunque una forma de realización de la presente invención contempla aplicar una composición localmente en una mancha hiperpigmentada, se ha de entender que las composiciones de la presente invención pueden aplicarse de forma más general en una o más superficies de la piel facial para reducir la aparición de manchas hiperpigmentadas dispuestas dentro de estas zonas de la piel facial.

20 Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar ciertas características y ventajas de diversas formas de realización de la invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplos

25 A continuación se describe la invención con referencia a los ejemplos siguientes. Estos ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no debería interpretarse en modo alguno que la invención está limitada por estos ejemplos, sino que más bien ha de interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que se hagan evidentes como resultado de la doctrina aquí proporcionada.

Ejemplo 1: Preparación de fracción de suero bioactiva derivada de hojas frescas de *Ficus benghalensis*.

La Fig. 1 es un dibujo esquemático que muestra una forma de realización del proceso para preparar la fracción de suero bioactiva a partir de hojas frescas de *Ficus*.

30 Se recogió una cantidad suficiente de hojas frescas de *Ficus benghalensis* para obtener aproximadamente 100 kg de materia seca. El nivel de materia seca medido en las hojas frescas fue de un 32,01%, lo que hizo necesario cosechar aproximadamente 312,4 kg de hojas frescas de las plantas para obtener 100 kg de materia seca. Se tuvo cuidado de preservar el contenido de humedad inherente de las hojas frescas y de evitar un marchitamiento debido a una pérdida de humedad. La recogida se llevó a cabo de manera que se evitase o se minimizase todo daño a las hojas frescas recogidas. Todos los pasos se completaron en el menor tiempo posible para minimizar la exposición de las hojas frescas al sol, a altas temperaturas y a otros factores medioambientales negativos.

40 A continuación, las hojas recogidas se lavaron durante ≤ 5 minutos y con ≤ 1 kg/cm² de presión de agua para eliminar de las hojas las partículas de tierra y otros restos antes de seguir procesándolas. El agua de lavado residual no contenía ningún pigmento verde o marrón, lo que indicaba la integridad del tejido de la hoja y una presión de agua y una duración de lavado adecuados. Se eliminó de las hojas lavadas el agua excedente. A continuación, las hojas de *Ficus* frescas lavadas se separaron mecánicamente, lo que separó eficazmente el jugo celular libre de fibras, que contenía la mayor parte del material intracelular de las células parenquimatosas, del material rico en fibras, que contenía predominantemente paredes celulares. No se añadió ningún disolvente exógeno ni agua antes ni durante el proceso de separación.

45 Las hojas lavadas se sometieron a trituración, maceración y prensado para obtener el contenido intracelular líquido (es decir el jugo celular) y para separarlo del material rico en fibras. Se utilizó un molino de martillo (Model VS 35, Vincent Corporation, Tampa, FL), con un motor de 5 CV y un juego de tamices, para triturar las hojas y producir partículas de tejido de hoja de un pequeño tamaño adecuado, en un espacio de tiempo muy breve y sin un aumento significativo de la temperatura de la biomasa. El molino de martillo se ajustó para producir un tamaño máximo de partículas de hoja maceradas $\leq 2,0$ centímetros durante ≤ 10 segundos de tratamiento. La temperatura de las hojas frescas maceradas aumentó sólo $\leq 2^\circ\text{C}$.

50 Para obtener jugo celular de las hojas frescas maceradas se utilizó inmediatamente una prensa de husillo horizontal continua (Compact Press CP-6, Vincent Corporation, Tampa, FL), equipada con un cono soportado mediante aire comprimido. La presión en el cono se mantuvo en un nivel ≥ 15 kg/cm², con una velocidad del husillo de 12 rpm. En estas condiciones, la temperatura del jugo celular aumentó sólo $\leq 5^\circ\text{C}$.

Este tratamiento produjo material rico en fibras y jugo celular. Las partículas de fibra pequeñas residuales se eliminaron adicionalmente del jugo celular por clarificación utilizando una centrífuga de flujo continuo (Model

12-413V, AML Industries, Inc., Hatboro, PA) con una unidad de descarga totalmente automática. Con un caudal de 2 litros/minuto, el tiempo de retención para la clarificación del jugo celular a ≤ 2.250 g era ≥ 100 segundos. Este régimen produjo jugo celular libre de fibras. El precipitado que contenía partículas de fibra pequeñas se recogió y se combinó con el resto del material rico en fibras producido después de prensar las hojas frescas.

- 5 Los procesos arriba descritos permitieron producir 160,9 kg de jugo celular, con un contenido de materia seca del 9,29%, y 151,5 kg de material rico en fibras, con un contenido de materia seca del 56,14%. El jugo celular se colocó enseguida en recipientes de HDPE (polietileno de alta densidad) rectangulares de 15 litros cerrados herméticamente y se congeló a -30°C . El jugo celular congelado en estado sólido se mantuvo a esta baja temperatura para su posterior utilización.
- 10 El jugo celular incluye tres tipos principales de componentes: (i) cloroplastos limitados por membrana, mitocondrias, retículo endoplasmático, núcleos, lisosomas, peroxisomas, vacuolas, aparato de Golgi; y (ii) ribosomas no limitados por membrana, microtúbulos; y (iii) componentes que no pertenecen a los grupos anteriores, tales como citoplasma. Debido a la presencia en el jugo celular de organelas y sus fragmentos, así como de pigmentos y proteínas no deseados, se requirió su fraccionamiento para producir un ingrediente de cuidado personal que tuviera una combinación deseable de propiedades funcionales, incluyendo, de forma no exclusiva, el color, la solubilidad, la transparencia, la estabilidad y las actividades *in vitro*. Para lograr estos objetivos, el jugo celular se fraccionó utilizando diversos tratamientos, que incluían fluidización del jugo celular, ajustes de pH, radiación de microondas concentrada, separación centrífuga y filtración al vacío. A continuación, la fracción de suero de jugo celular aislada resultante se estabilizó con conservantes y antioxidantes.
- 15
- 20 La duración y la intensidad de los tratamientos del jugo celular se minimizaron para eliminar estreses oxidativos, hidrólisis, desnaturalización, isomerización, polimerización y otros procesos no deseados.

La transformación del jugo celular del estado congelado en recipientes de 15 litros al estado líquido inicial se realizó mediante fluidización durante ≤ 2 minutos. Durante este tratamiento, la temperatura del jugo celular aumentó sólo a $\leq 20^{\circ}\text{C}$. La corta duración de este tratamiento permitió minimizar tanto los procesos de desnaturalización como el daño oxidativo. Las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas del jugo celular después de su congelación y fluidización eran idénticas a sus propiedades correspondientes medidas durante la separación del jugo celular de las hojas frescas. Entre estas propiedades se incluían, de forma no exclusiva, su contenido de materia seca, su pH, su conductividad, su potencial redox, su osmolalidad y sus espectros IR.

- 25
- 30 A continuación, el pH del jugo celular, que estaba próximo al neutro, se ajustó empleando un método de titulación en el que se utilizó ácido clorhídrico (HCl) 5,0N para disminuir el pH del jugo celular a $\geq 3,0$ (ajuste de pH 1). El jugo celular ajustado se trató inmediatamente mediante radiación de microondas concentrada con una frecuencia de 2.450 MHz. Durante este procesamiento con microondas concentradas (FMP), la temperatura del jugo celular aumentó momentáneamente a 90°C , se mantuvo a esta temperatura durante 1 minuto y a continuación la temperatura del jugo celular se disminuyó inmediatamente a $\leq 30^{\circ}\text{C}$. Después, el jugo celular tratado se separó rápidamente utilizando una centrifuga de flujo continuo CEPA LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Alemania) a 15.000 rpm y con un tiempo de retención ≥ 30 segundos. La separación de 15,0 kg de jugo celular tratado produjo 1,37 kg de precipitado en pasta de color verde ("Precipitado I") y 13,63 kg de sobrenadante líquido ligeramente opalescente de color marrón claro ("Sobrenadante I") con un contenido de materia seca del 6,75%. Este Sobrenadante I se utilizó para un fraccionamiento posterior.
- 35
- 40 La Tabla 1 muestra los datos relacionados con el efecto de la máxima temperatura alcanzada durante el tratamiento FMP (Tmax) de jugo celular de pH ajustado en el contenido de materia seca del Sobrenadante I, y su color y presencia de clorofila a y clorofila b (determinados mediante las mediciones de absorción de luz a 662 nm y 642 nm, respectivamente).

Tabla 1 Efecto de Tmax de FMP en parámetros seleccionados de Sobrenadante I

Tmax de FMP °C	Materia seca %	Color (escala Gardner)	Absorción a 662 nm	Absorción a 642 nm
20 (control)	6,19	6,5	0,044	0,032
60	6,45	8,0	0,017	0,014
90	6,95	8,5	< 0,005	< 0,005
120	6,39	9,0	< 0,005	< 0,005
140	6,35	10,5	< 0,005	< 0,005
150	6,33	12,5	< 0,005	< 0,005
170	5,72	14,5	< 0,005	< 0,005
200	5,44	18,5	< 0,005	< 0,005

- 45
- Los datos de la Tabla 1 muestran que el Sobrenadante I obtenido a Tmax = 90°C tiene un mayor contenido de materia seca y no contiene clorofila. Aunque el valor en la escala Gardner es menor en el Sobrenadante I obtenido después de Tmax = 60°C , esta preparación tiene un contenido de materia seca significativamente menor y contiene una mayor cantidad residual de clorofilas. Además de la presencia no deseada de este pigmento en los ingredientes cosméticos, la clorofila puede transformarse en feoforbidos, que se consideran
- 50

compuestos tóxicos (Bergstrom, L.C., Vucenik, I., Hagen, I.k., Chernomorsky S.A., Poretz R.D. In-vitro photocytotoxicity of lysosomotropic immunoliposomes containing pheophorbide a with human bladder carcinoma cells. - J. Photochem. Photobiol., 24, 1, 17 - 23, 1994) y responsables de una irritación de la piel (Kato T., Yamada K. Relationship between appearance of photosensitization and total pheophorbide level in spirulina powder. -- J. Food Hyg. Soc. Japan, 36, 632 - 634, 1995).

Basándonos en las razones anteriores, se seleccionó Tmax de FMP = 90°C del jugo celular ajustado como el régimen preferente para obtener el Sobrenadante I, que a continuación se utilizó para un posterior fraccionamiento con el objetivo de mejorar las propiedades funcionales, incluyendo, de forma no exclusiva, el color, la transparencia y la estabilidad del ingrediente de cuidado personal. Hay que señalar que el Sobrenadante I tenía actividades *in vitro* deseables tales como (i) actividades de inhibición enzimática, incluyendo, de forma no exclusiva, actividades de inhibición de tirosinasa, de elastasa, de tripsina, de ciclooxigenasa-2 (COX-2), (ii) actividad de barrido de radicales libres y (iii) actividad antioxidante, incluyendo, de forma no exclusiva, capacidad de absorción de radicales de oxígeno. Teniendo en cuenta la importancia crítica de todas las actividades *in vitro* anteriores, éstas no deberían verse afectadas por los tratamientos posteriores necesarios para mejorar las propiedades funcionales del ingrediente de cuidado personal deseable. Con respecto a la mejora de la composición, el Sobrenadante I debería tratarse adicionalmente para eliminar de un modo significativo los pigmentos marrones y otros compuestos no deseados, incluyendo proteínas residuales.

Para lograr este objetivo, el Sobrenadante I se sometió a un tratamiento posterior que incluía ajustes de pH y separaciones. El primer tratamiento se indujo empleando un método de titulación en el que se utilizó hidróxido sódico (NaOH) al 50% para aumentar el pH del sobrenadante de jugo celular de ~ 3,0 a ~ 7,5 (ajuste de pH 2). Hay que señalar que por encima de un pH = 7,5 el Sobrenadante II perdía actividades de inhibición de elastasa y tripsina deseadas. El ajuste de pH 2 tuvo como resultado un color más oscuro del material y una opalescencia desarrollada, que se clarificó inmediatamente utilizando una centrifuga de flujo continuo CEPA LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Alemania) a 15.000 rpm y con un tiempo de retención \geq 30 segundos. Esta separación produjo 0,53 kg de precipitado en pasta de color marrón (en lo que sigue Precipitado II) y 13,10 kg de sobrenadante ligeramente opalescente de color marrón (en lo que sigue Sobrenadante II) con un contenido de materia seca del 6,59%.

A continuación, el Sobrenadante II se sometió a una titulación utilizando ácido clorhídrico (HCl) 5,0N para disminuir el valor pH a un pH ~ 3,6 (ajuste de pH 3). Tal tratamiento llevó a un color más claro del Sobrenadante II titulado, aunque su opalescencia había aumentado ligeramente. Este material se trató con una filtración esterilizante a través de una membrana con un tamaño de poros de 0,2 micrómetros. El resultado de ello fue una fracción de suero de hojas de *Ficus* frescas transparente de color claro.

El valor de color de la fracción de suero (valor en la escala Gardner = 7,0) fue menor que el valor de color del Sobrenadante I (valor en la escala Gardner = 8,5). Hay que señalar que el valor de color en la escala Gardner de las fracciones de suero fue siempre menor que el valor de color de los Sobrenadantes I correspondientes, obtenidos en diferentes condiciones de Tmax de FMP (Tabla 2).

Tabla 2 Efecto de la Tmax de FMP utilizada para el tratamiento del jugo celular en el color (escala Gardner) del Sobrenadante I y la fracción de suero

Tmax de FMP °C	Sobrenadante I	Fracción de suero
20 (control)	6,5	6,5
60	8,0	7,0
90	8,5	7,0
120	9,0	7,5
140	10,5	7,5
150	12,5	10,5
170	14,5	13,5
200	18,5	15,5

La fracción de suero obtenida del jugo celular después de su fluidización, los ajustes de pH (dentro del intervalo de pH de 3,0 a 7,0), la radiación de microondas concentrada (Tmax de FMP = 90°C durante 1 minuto), la separación centrífuga y la filtración esterilizante mostraba todas las actividades de inhibición enzimática deseables, actividad de barrido de radicales libres y actividad antioxidante.

Con respecto a la determinación del contenido de proteínas residuales en la fracción de suero, que contenía compuestos fenólicos capaces de interferir con los ensayos colorimétricos, se utilizó el método de Kjeldahl para detectar de forma fiable el contenido de nitrógeno de la fracción de suero y sus ultrafiltrados. Se utilizaron diferentes membranas para separar la fracción de suero en tres filtrados, que tenían pesos moleculares \leq 15, \leq 10 y \leq 5 kilodaltons (kD) respectivamente. Los datos relacionados con el contenido de nitrógeno en las muestras se indican en la Tabla 3.

Tabla 3 Efecto de las condiciones de ultrafiltración en el contenido de nitrógeno de la fracción de suero de filtración

Muestra	Contenido de nitrógeno (método Kjeldahl) %
Fracción de suero (control)	0,064
Filtrado de fracción de suero ≤ 15 kD	0,063
Filtrado de fracción de suero ≤ 10 kD	0,060
Filtrado de fracción de suero ≤ 5 kD	0,059

5 Los datos demuestran que el contenido de nitrógeno no había cambiado de forma significativa después de la ultrafiltración, incluso a través de la membrana con un bajo peso molecular límite, lo que indicaba que prácticamente todo el nitrógeno de la fracción de suero era no proteínico, es decir que la fracción de suero no contiene proteínas.

10 Se realizó una estabilización adicional de la fracción de suero añadiendo antioxidantes, estabilizadores, agentes quelantes y conservantes. A continuación se indica la composición de aditivos utilizada para estabilizar la fracción de suero como se ha descrito en el presente ejemplo 1: 0,2% de metabisulfito de sodio, 0,1% de sorbato de potasio, 0,1% de benzoato de sodio y 0,1% de metilparabeno sódico. La mezcla se incubó hasta lograr una solubilización completa (≥ 30 minutos). A continuación se añadió un 1,9% de pentilenglicol a la mezcla.

15 La fracción de suero contenía aproximadamente un 6,38% de materia seca y su rendimiento a partir de hojas de *Ficus* frescas fue de aproximadamente un 36%. El rendimiento de materia seca de la fracción de suero a partir de 100 kg de materia seca de las hojas de *Ficus* frescas iniciales fue de aproximadamente 7,2 kg.

En la Tabla 4 y la Tabla 5 se presentan características de la fracción de suero y sus actividades *in vitro* seleccionadas.

Tabla 4 Características seleccionadas de la fracción de suero obtenida a partir de *Ficus benghalensis*

Características	Resultados
Aspecto	Líquido amarillo claro
Olor	Característico
Solubilidad en agua	Soluble en cualquier proporción
Color (escala Gardner)	7.0
Materia seca (%)*	6,38
Índice de refracción (nD)	1,3479
pH	4,03
Osmolalidad (mOsm/kg)	874
Características espectros UV (nm)	Máx 200 Punto de inflexión ~264 Punto de inflexión ~320
Recuento en placa total (UFC/10 g)	< 10
Moho y levaduras (UFC/10 g)	< 10
<i>Escherichia coli</i> (UFC/10 g)	Negativo
<i>Salmonella sp.</i> (UFC/10 g)	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/10 g)	Negativo
<i>Pseudomonas sp.</i> (UFC/10 g)	Negativo

*) La materia seca (%) se indica para el producto antes de la adición de estabilizadores.

20

Tabla 5 Actividades *in vitro* seleccionadas de fracción de suero calculadas en base al porcentaje de materia seca

Actividades	Resultados
Actividad de inhibición de la tirosinasa (CI50, mg/ml)	0,362
Actividad de inhibición de la elastasa (CI50, mg/ml)	0,067
Actividad de inhibición de la tripsina (CI50, mg/ml)	0,342
Actividad de inhibición de la ciclooxigenasa-2 (CI50, mg/ml)	5,40
Actividad de barrido de radicales libres (1/X)*	2,57
Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (1/Y)**	0,98

*) X - número de unidades peso seco artículo de ensayo para barrer por completo 1 unidad peso seco DPPH; **) Y - número de unidades peso seco artículo de ensayo para producir efecto antioxidante igual a efecto de 1 unidad peso seco éter metílico (R)-Trolox.

25 **Ejemplo 2: Comparación de características y actividades *in vitro* de fracciones de suero obtenidas a partir de jugo celular de *Ficus benghalensis***

Se recogieron hojas de *Ficus* frescas en diferentes lugares y se procesaron para obtener jugo celular como se ha descrito en el Ejemplo 1. Este jugo celular se congeló y se almacenó a -30°C en recipientes de HDPE rectangulares de 15 litros cerrados herméticamente. Se procesaron uno o más recipientes a la vez para obtener fracción de suero utilizando el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 1.

- 5 Los datos mostrados en las Tablas 6 y 7 muestran la variabilidad de las características y actividades *in vitro* seleccionadas de fracciones de suero obtenidas de múltiples fraccionamientos de la misma fuente de jugo celular congelado en diferentes momentos, así como de fraccionamientos a partir de diferentes fuentes de jugo celular congelado.

10 Tabla 6 Características seleccionadas de fracciones de suero obtenidas a partir de jugo celular de *Ficus benghalensis*

Características	Resultados
Aspecto	Líquido entre amarillo claro y amarillo rojizo
Olor	Característico
Solubilidad en agua	Soluble en cualquier proporción
Color (escala Gardner)	6,0 - 7,5
Materia seca (%)*	6,0 - 7,05
Índice de refracción (nD)	1,3479 - 1,3488
pH	3,88 - 4,03
Osmolalidad (mOsm/kg)	860 - 972
Características de espectros UV (nm)	Máx 200 Punto de inflexión ~264** Punto de inflexión ~280** Punto de inflexión ~320**
*) La materia seca (%) se indica para los productos antes de la adición de estabilizadores; **) Los puntos de inflexión pueden identificarse en algunas muestras dependiendo de análisis espectrales con diferente ajuste.	

Tabla 7 Actividades *in vitro* seleccionadas de fracción de suero calculadas sobre la base del porcentaje de materia seca

Actividades	Resultados
Actividad de inhibición de la tirosinasa (CI50, mg/ml)	0,133 - 0,437
Actividad de inhibición de la elastasa (CI50, mg/ml)	0,067 - 0,103
Actividad de inhibición de la tripsina (CI50, mg/ml)	0,342 - 1,003

15 **Ejemplo 3: Preparación de extracto acuoso de hoja de *Ficus benghalensis* secas**

- Se trituraron 50 g de hojas de *Ficus benghalensis* secadas al aire (recogidas del mismo lote de hojas que el utilizado en el Ejemplo 1) con un molino de cuchillas GM200 Grindomix (Retsch, Alemania) para obtener partículas con un tamaño < 300 micrómetros. La trituración incluyó 20 segundos a 2.500 rpm, seguidos de 10 segundos a 2.500 rpm y a continuación 10 segundos a 10.000 rpm. Las hojas trituradas se homogeneizaron con agua desionizada utilizando un OMNI Programmable Digital Homogenizer (OMNI International, Kennesaw, GA). Los 35 g de hojas trituradas se mezclaron con 490 g de agua y se colocaron en un baño de hielo sobre la plataforma del homogeneizador. La homogeneización se llevó a cabo con un generador de homogeneizador de 20 mm durante 15 min a 15.000 rpm. A continuación se sometió el homogeneizado a un tratamiento con microondas durante 1 minuto a 90°C en un Initiator 2 Focused Microwave Processor (Biotage AB, Uppsala, Suecia). Después, el material tratado con microondas se centrifugó durante 30 minutos a 3.200 g. A continuación se filtró el sobrenadante 42 bajo vacío a través de tres capas de papel Whatman n°: 2 y el filtrado se tituló con ácido clorhídrico (HCl) hasta pH 4,0. El material titulado se centrifugó durante 30 minutos a 3.200 g y después se filtró el sobrenadante bajo vacío a través de un filtro esterilizante de 0,2 micrómetros. Se añadieron estabilizadores a la muestra: 0,2% de metabisulfito de sodio, 0,1% de sorbato de potasio, 0,1% de ácido cítrico, 0,1% de benzoato de sodio. La mezcla se incubó hasta lograrse una solubilización completa (≥ 30 minutos). El extracto de hoja seca obtenido se colocó en viales de vidrio y se almacenó a oscuras a temperatura ambiente. En la Tabla 8 se presentan características y actividades *in vitro* seleccionadas de extracto acuoso de hojas secas de *Ficus*.

35 Tabla 8 Características y actividades *in vitro* seleccionadas de extracto acuoso de hojas secas de *Ficus benghalensis*

Características o actividades*	Resultados
Aspecto	Líquido marrón rojizo
Olor	Característico
Solubilidad en agua	Soluble en cualquier proporción
Color (escala Gardner)	13,0

Materia seca (%)*	2,23
Índice de refracción (nD)	1,3373
pH	3,98
Osmolalidad (mOsm/kg)	261
Características de espectros UV (nm)	Máx 200 Punto de inflexión ~278 Punto de inflexión ~320
Actividad de inhibición de la tirosinasa (CI50, mg/ml)	1,45
Actividad de barrido de radicales libres (1/X)**	3,40
Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (1/Y)***	1,04
*) Las actividades <i>in vitro</i> mostradas están calculadas en base al porcentaje de materia seca; **) X - número de unidades peso seco artículo de ensayo para barrer por completo 1 unidad peso seco DPPH; ***) Y - número de unidades peso seco artículo de ensayo para producir efecto antioxidante igual a efecto de 1 unidad peso seco éter metílico (R)-Trolox.	

- 5 Dentro del amplio intervalo de concentraciones ensayadas, el extracto acuoso de hojas secas de *Ficus* no mostró actividades de inhibición de elastasa, tripsina y ciclooxigenasa-2. En la Tabla 9 se muestra la comparación de las características y actividades *in vitro* seleccionadas del extracto acuoso y la fracción de suero obtenidos del mismo lote de hojas de *Ficus benghalensis*.

Tabla 9 Comparación de características y actividades *in vitro** seleccionadas del extracto acuoso y la fracción de suero obtenidos del mismo lote de hojas de *Ficus benghalensis*

Características o actividades	Extracto acuoso	Fracción de suero
Aspecto	Líquido marrón rojizo	Líquido amarillo claro
Olor	Característico	Característico
Solubilidad en agua	Soluble en cualquier proporción	Soluble en cualquier proporción
Color (escala Gardner)	13,0	7,0
Materia seca (%)*	2,23	6,38
Índice de refracción (nD)	1,3373	1,3479
pH	3,98	4,03
Osmolalidad (mOsm/kg)	261	874
Características de espectros UV (nm)	Máx 200 Punto de inflexión ~278 Punto de inflexión ~320	Máx 200 Punto de inflexión ~264 Punto de inflexión ~320
Actividad de inhibición de la tirosinasa (CI50, mg/ml)	0,72	0,362
Actividad de inhibición de la elastasa (CI50, mg/ml)	No detectada	0,067
Actividad de inhibición de la tripsina (CI50, mg/ml)	No detectada	0,342
Actividad de inhibición de la ciclooxigenasa-2 (CI50, mg/ml)	No detectada	5,40
Actividad de barrido de radicales libres (1/X)**	3,40	2,57
Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (1/Y)***	1,04	0,98
*) Las actividades <i>in vitro</i> presentadas están calculadas en base al porcentaje de materia seca; **) X - número de unidades peso seco artículo de ensayo para barrer por completo 1 unidad peso seco DPPH; ***) Y - número de unidades peso seco artículo de ensayo para producir efecto antioxidante igual a efecto de 1 unidad peso seco éter metílico (R)-Trolox.		

10 **Ejemplo 4: Características y actividades *in vitro* de fracciones de suero obtenidas de diferentes especies de *Ficus* y lugares**

Además de hojas de *Ficus benghalensis* recogidas en India y Florida (EE.UU.), se utilizaron para el fraccionamiento, con el fin de obtener fracción de suero hojas frescas de las especies de *Ficus* siguientes: *Ficus carica*, *Ficus elastica*, *Ficus microcarpa* y *Ficus trigonata*. Excepto *Ficus trigonata*, que se había cultivado en Puerto Rico, estas especies de *Ficus* se habían cultivado en Florida, EE.UU.

- 15 Se obtuvieron fracciones de suero con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Todas estas fracciones se compararon con respecto a su rendimiento y sus propiedades fisicoquímicas y actividades *in vitro* seleccionadas (Tabla 10, Tabla 11 y Tabla 12).

Tabla 10 Comparación de productos de fraccionamiento de hojas frescas de *Ficus*

Especie de <i>Ficus</i>	Materia seca hojas frescas %	Rend. jugo celular %	Materia seca jugos celulares %	Color jugo celular	pH jugo celular	Rend. fracción de suero %	Materia seca frac. suero
F. benghalensis (India)	32,01	51,5	9,29	Verde claro	6,31	36,0	6,38
F. benghalensis (Florida)	32,21	41,1	9,53	Verde claro	6,08	32,2	7,05
F. carica (Florida)	16,25	66,1	6,38	Marrón oscuro	6,71	51,6	5,14
F. elastica (Florida)	19,63	60,6	6,03	Marrón	5,60	40,6	5,43
F. microcarpa (Florida)	28,76	46,2	9,13	Verde	6,74	30,1	8,06
F. trigonata (Puerto Rico)	25,12	44,2	5,67	Verde oscuro	5,71	32,4	5,39

5 Los datos anteriores demuestran que, entre diferentes especies de *Ficus*, el contenido de materia seca en las hojas frescas, el rendimiento del jugo celular y el rendimiento de las fracciones de suero, así como su contenido de materia seca, color y pH, variaron de forma muy significativa. Las diferencias correspondientes entre dos *Ficus benghalensis* cultivadas en India y en Florida eran menos marcadas que las diferencias entre especies de *Ficus* distintas.

10 Esta conclusión está apoyada por datos adicionales relacionados con la comparación de características fisicoquímicas (Tabla 11) y actividades *in vitro* seleccionadas de fracciones de suero obtenidas de diferentes especies de *Ficus* (Tabla 12).

Tabla 11 Comparación de fracciones de suero obtenidas de diferentes especies de *Ficus*

	F. benghalensis (India)	F. benghalensis (Florida)	F. carica	F. elastica	F. microcarpa	F. trigonata
Aspecto	Líquido amarillo transparente	Líquido amarillo transparente	Líquido naranja transparente	Líquido amarillo transparente	Líquido amarillo transparente	Líquido naranja transparente
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
Solubilidad en agua	Soluble en cualquier propor.	Soluble en cualquier propor.	Soluble en cualquier prop.	Soluble en cualquier prop.	Soluble en cualquier prop.	Soluble en cualquier prop.
Color (escala Gardner)	7,0	7,5	11,5	7,5	9,5	11,5
Materia seca (%)	6,38	7,05	5,14	5,43	8,06	5,39
Índice de refracción (nD)	1,3479	1,3488	1,3453	1,3456	1,3515	1,3460
pH	4,03	3,88	3,95	3,86	3,90	3,86
Osmolalidad (mOsm/kg)	874	972	801	817	913	817
Características de espectros UV (nm)	Máx 200 Punto infl. ~264 Punto infl. ~320	Máx 200 Punto infl. ~264 Punto infl. ~320	Máx 200 Inflexión 210 Seno 237 Pico 255 Pico 318	Máx 200 Inflexión 227 Pico 256 Punto infl. ~316	Máx 200 Pico 205 Pico 268 Punto infl. ~310	Máx 200 Pico 257 Pico 317

Tabla 12 Actividades *in vitro** seleccionadas de fracciones de suero de *Ficus* obtenidas de diferentes especies de *Ficus*

	F.benghalensis (India)	F.benghalensis (Florida)	F. carica	F. elastica	F.microcarpa	F.Trigonata
Actividad inhibición tirosinasa (CI50, mg/ml)	0,362	0,437	0,049	0,482	0,482	0,490
Actividad inhibición tripsina (CI50, mg/ml)	0,342	1,003	1,074	> 100 (ineficaz)	1,235	4,010
Actividad inhibición elastasa (CI50, mg/ml)	0,067	0,092	1,543	1,175	0,549	1,219
Actividad inhibición COX-2 (CI50, mg/ml)	5,40	3,1	> 200 (ineficaz)	> 200 (ineficaz)	0,7	> 200 (ineficaz)
Actividad barrido radicales libres (1/X)**	2,57	2,82	11,41	11,16	3,27	4,53
Capacidad absorción radicales oxígeno (1/Y)***	0,98	1,01	1,88	2,91	0,54	1,18

*) Las actividades *in vitro* presentadas están calculadas en base al porcentaje de materia seca; **) X - número de unidades peso seco artículo de ensayo para barrer por completo 1 unidad peso seco DPPH; ***) Y - número de unidades peso seco artículo de ensayo para producir efecto antioxidante igual a efecto de 1 unidad peso seco éter metílico (R)-Trolox.

5 **Ejemplo 5: Comparación de cromatogramas CL/UV/EM de extracto de *Ficus* tradicional y de fracción de suero de *Ficus* (*Ficus benghalensis*)**

Se detectaron componentes del extracto de *Ficus* y de la FSF tanto mediante detección de UV de 240-500 nm como mediante espectrometría de masas por electroespray, en modos tanto de ion positivo (m/z 150-150) como de ion negativo (m/z 100-1100), después de una separación por CL en una columna C18. Debido a las altas frecuencias de exploración utilizadas en una EM de cuadrípulo, en los cromatogramas de masas se observaron sólo los componentes principales y/o los componentes con altas eficacias de ionización. El extracto de *Ficus* de la fracción de suero de *Ficus* se analizó mediante TDV/EM (tiempo de vuelo/espectrometría de masas) y las asignaciones estructurales están basadas en estos datos exactos de masa y fragmentación en la fuente.

10 Como se muestra en la Figura 2, el extracto de *Ficus* tradicional contiene más compuestos de elución tardía (más hidrófobos), que no se detectan en la FSF. Como se muestra en la Figura 3, un grupo de compuestos de elución tardía parecen ser feoforbidos, que son productos de degradación de la clorofila. La Figura 4 muestra que el extracto tradicional contiene mayores cantidades de lo que probablemente son glucósidos de flavonol. Como queda demostrado en la Figura 5, la FSF tiene mayores niveles (aproximadamente 10x) de catequina y taninos condensados relacionados. Sin embargo, los niveles de los tres isómeros de ácido cafeoilquínico no parecen ser esencialmente diferentes entre las dos muestras, como queda demostrado en la Figura 6. La Figura 7 demuestra que la FSF contiene mayores niveles de tirosina, fenilalanina y triptófano libres.

Método:

Prep. de muestra de fracción de suero de *Ficus*:

25 Se preparó FSF como en el Ejemplo 1. La muestra de FSF se diluyó 50 veces con agua:DMSO 90:10 (20 µl de muestra + 100 µl de DMSO + 880 µl de agua) y se analizó mediante CL/UV/EM según las condiciones abajo indicadas. El contenido aproximado de sólidos en la muestra final fue de ~1,26 mg/ml.

Prep. de muestra tradicional:

30 Se pesaron 10,64 mg de la muestra en un vial de vidrio de 4 ml. Se añadieron 1,064 ml de DMSO al vial y se sometieron a ultrasonidos durante 30 minutos, y ocasionalmente se formaron vórtices para mezclar. 100 µl de esta muestra se colocaron en un vial de vidrio de 4 ml y se diluyeron con 900 µl de agua. Contenido aproximado de sólidos en la muestra final ~1 mg/ml.

Condiciones CLAP (cromatografía líquida a alta presión):

CLAP:	Waters Acquity UPLC Binary Solvent Manager	S/N M05UPB601M
	Waters Acquity UPLC Sample Manager	S/N M05UPS632M
	Waters Acquity UPLC PDA Detector	S/N M05UPD879N
35 EM:	Waters Micromass Quattro Premier	MS S/N VAA-219

Columna CL: Waters Acquity UPLC BEH C18, 1,7 mm, 2,1 x 100 mm, nº pieza 186002352, nº lote 0150371861

Fase móvil: A: Agua con ácido fórmico al 0,1%
 B: Acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%
 Separación: Gradiente (véase la tabla)

Tiempo (min)	Caudal	%A	%B	Curva
Inicial	0,400 ml/min	95,0	5,0	
0,5	0,400 ml/min	95,0	5,0	6
6,5	0,400 ml/min	70	30	6
13,5	0,400 ml/min	0,0	100,0	6
17,5	0,400 ml/min	0,0	100,0	6
18,0	0,400 ml/min	95,0	5,0	6
19,0	0,400 ml/min	95,0	95,0	6

5 Volumen de inyección: 7,5 µl bucle parcial con sobrealimentación de aguja

Temperatura de columna = 25°C

PDA 240-500 nm a 20 puntos/seg., constante de tiempo de filtro 0,2 seg., tiempo de exposición = automático, resolución 1,2 nm

Condiciones EM:

	Electrospray (+)	Electrospray (-)
Capilar (kV)	3,0	3,0
Cono (V)	30	40
Extractor (V)	2	3
Objetivo RF (V)	0,2	1,0
Temperatura fuente	120°C	120°C
Temperatura desolvatación	350°C	350°C
Caudal de gas cono	50 l/h	50 l/h
Caudal de gas desolvatación	900 l/h	800 l/h
Intervalo de masas de exploración	150-1.150	100-1.100
Duración de exploración	0,300 seg.	0,300 seg.
Retraso entre exploraciones	0,025 seg.	0,025 seg.

10 Ejemplo 6: Síntesis de melanina

En el ensayo se empleó una línea celular de melanoma de ratón B16-F1. Las células B16-F1 se obtuvieron de la American Tissue Culture Collection, Virginia, EE.UU. El medio de cultivo celular utilizado en el ensayo comprende 500 ml de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 50 ml de suero fetal bovino (FBS = *Fetal Bovine Serum*) y 5 ml de líquido de penicilina-estreptomina. Las células B16-F1 cultivadas en este medio y que han crecido hasta más de un 90% de confluencia sintetizan melanina. Aunque la intención no es restringirse a ninguna teoría, se plantea la hipótesis de que la síntesis de melanina es estimulada por el medio de cultivo y/o el estrés inducido por crecimiento hasta una alta confluencia. El DMEM y el FBS pueden obtenerse de la American Tissue Culture Collection y el líquido de penicilina-estreptomina puede obtenerse de Invitrogen, Inc., California, EE.UU. El equipo utilizado en el ensayo incluye un incubador de CO₂, tal como un Forma Series Model 3110 de Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.; un hemocitómetro, tal como un modelo Bright Line de Hauser Scientific, Pensilvania, EE.UU.; y un lector de placas de espectro UV-Visible, tal como un SpectraMax250 de Molecular Devices, California, EE.UU. Los pasos del ensayo incluyen:

Día 0 - Crecimiento celular: Calentar el medio de cultivo celular a 37°C y colocar 29 ml en un matraz T-150. Añadir aproximadamente 1x10⁶ de células de ratón B16-F1 pasada l al matraz T-150 y se incubaron durante 3 días a 37°C, 5% de CO₂, 90% de humedad relativa, hasta una confluencia de ~80%.

Día 3 - Iniciar una placa de 96 pocillos: El día 3, tripsinizar las células del matraz T-150 y determinar la concentración de células utilizando el hemocitómetro. Iniciar una placa de 96 pocillos con 2.500 células por pocillo en 100 µl de medio de cultivo celular. Incubar la placa a 37°C, 5% de CO₂, 90% de humedad relativa, durante 2 días hasta una confluencia de al menos un 20% a un 40%.

Día 5 - Retirar el medio de cultivo celular de la placa y reemplazar por medio de cultivo fresco (100 µl por pocillo). Añadir 1 µl de [compuesto de ensayo] diluido en un disolvente [agua o DMSO]. Para generar una curva de dosis respuesta pueden ensayarse múltiples proporciones de dilución, tratándose preferiblemente tres pocillos con cada proporción de dilución. Los controles comprenden pocillos que tienen el medio de cultivo celular, células W6-F1 y el disolvente (control nº 1); pocillos que comprenden el medio de cultivo celular y el disolvente (control nº 2); y opcionalmente pocillos que comprenden el medio de cultivo celular, el disolvente y

[compuesto de ensayo] cuando es necesario controlar el color de fondo del [compuesto de ensayo] (control nº 3).

5 Día 7 - Medir la producción de melanina: Las células deberían tener una confluencia mayor que ~90%. En caso contrario no se utiliza este punto de datos. Añadir 100 µl de una solución de hidróxido sódico al 0,75% a cada pocillo. Leer la placa de 96 pocillos utilizando el lector de placas UV-Vis a 410 nm para medir ópticamente la cantidad de melanina producida entre los pocillos que han sido tratados con [compuesto de ensayo] y los pocillos de control que no lo han sido. Los pocillos en los que se produce melanina aparecen de un color parduzco. Los pocillos en los que se produce poca melanina aparecen de un color entre transparente y púrpura claro. El porcentaje de la inhibición de la síntesis de melanina se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$10 \quad \frac{100 - [\text{DO410 compuesto de ensayo} - \text{DO410 control nº 2}] \times 100}{(\text{DO410 control nº 1} - \text{DO410 control nº 2})}$$

En esta ecuación, DO410 es la densidad óptica a 410 nm, medida mediante el lector de placas de espectro UV-Vis.

Cuando se utiliza el control nº 3, la fórmula para el porcentaje de inhibición de la síntesis de melanina es:

$$15 \quad \frac{100 - [\text{DO410 compuesto de ensayo} - \text{DO410 control nº 3}] \times 100}{(\text{DO410 control nº 1} - \text{DO410 control nº 2})}$$

Utilizando de forma general el ensayo arriba esbozado, la síntesis de melanina en células B16-F1 tratadas con FSF se inhibió en comparación con las células de control como se muestra a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13a - Datos de FSF B16

Concentración de FSF (p/v%)	1%	0,2%	0,04%	0,008%	0,0016%	0,000064%
Porcentaje de inhibición	48,1%	11,4%	5,5%	5,5%	-3%	-1,6%
Confluencia (inspección visual)	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%

20

Tabla 13b - Producto extraído con disolvente de hoja seca de *Ficus*

Producto extraído con disolvente de hoja seca	% Inhibición
dilución	Ficus R
0,01	23
0,005	8
0,0025	1
0,00125	-8
0,000625	-3
0,0003125	-2
0,00015625	2
0,000078125	2

25

Aunque no implica necesariamente un resultado *in vivo* con respecto a las manchas faciales hiperpigmentadas en humanos en vista de variables tales como las complejidades de la producción de melanina y la transferencia dentro de la piel y la capacidad de penetración en la piel de un compuesto de ensayo, este ensayo demuestra una capacidad de los materiales tales como la FSF para influir potencialmente en la actividad de la tirosinasa.

Ejemplo 7: Inhibición de tirosinasa

30 La tirosinasa es una importante enzima en la biosíntesis de melanina. Este ensayo puede identificar agentes que pueden interferir con la capacidad de la enzima tirosinasa de hongo para convertir L-tirosina en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

Reactivos y suministros

- Enzima tirosinasa: Tirosinasa de hongo, disponible en Sigma-Aldrich, Misuri, EE.UU.
- Sustrato enzimático: L-tirosina, disponible en Sigma-Aldrich, Misuri, EE.UU.
- Tampón: Solución salina tamponada con fosfato (PBS), disponible en Invitrogen, California, EE.UU.
- 35 Control positivo: 4-hidroxifenil-β-D-glucopiranosido (arbutina), disponible en Sigma-Aldrich, Misuri, EE.UU.
- Dimetil sulfóxido (DSMO), disponible en Sigma-Aldrich, Misuri, EE.UU.
- Placas de 96 pocillos de fondo plano, transparentes, tratadas con cultivo no tisular Falcon® 1172 Microtesttm
- Inhibidor potencial de tirosinasa
- Lector de placas de pocillos: Spectra MAX Plus, disponible en Molecular Devices, California, EE.UU.
- 40 Software de adquisición y análisis de datos: SoftMax Pro, disponible en Molecular Devices, California, EE.UU.

Concentración de solución de trabajo	Concentración final en ensayo
Enzima tirosinasa: 26 unidades/ml	13 unidades/ml
Sustrato de L-tirosina: 1 mM	0,5 mM

Control positivo de arbutina: 20 mM 200 µM

Protocolo de ensayo:

Preparar reactivos y controles positivos

5 Se prepara una solución de trabajo de sustrato enzimático 1 mM añadiendo 0,0181 g de L-tirosina a 100 ml de 1XPBS. Someter a ultrasonidos hasta que esté disuelta la L-tirosina. Formar vórtices según sea necesario. Almacenar a 4°C cuando no se esté utilizando.

10 Preparar una solución madre 0,2M de control positivo de arbutina añadiendo 0,0544 g de arbutina a 1 ml de DMSO. Formar vórtices y someter a ultrasonidos durante 1 minuto hasta que esté disuelta la arbutina. Diluir la solución 1:10 añadiendo 100 µl a 900 µl de DMSO para una solución de trabajo de arbutina 20 mM. Almacenar a temperatura ambiente hasta su uso.

Los inhibidores potenciales de tirosinasa deberían prepararse en DMSO. El volumen final del compuesto de ensayo en el ensayo es de 2 µl, por lo que las soluciones de trabajo se preparan normalmente a 5-40 mM (100X), lo que produce una concentración final de 50-400 µM en el ensayo.

15 Reconstituir la enzima tirosinasa en 1.000 U/ml con 1XPBS fría. Almacenar esta solución madre en alícuotas de 1 ml protegidas de la luz a -20°C hasta que se necesite. La solución enzimática de trabajo de 26 U/ml se prepara añadiendo 1 ml de solución madre descongelada (1.000 U/ml) a 37,5 de 1X tampón PBS frío. Esto es suficiente para cuatro placas de 96 pocillos. Proteger de la luz y conservar en hielo hasta que se utilice en el ensayo.

Realizar ensayo

20 Añadir 200 µl de 1X tampón PBS para triplicar los pocillos en cada placa de ensayo para un ensayo en blanco adecuado.

Añadir 2 µl de DMSO para triplicar los pocillos para un control de vehículo.

Añadir 2 µl de arbutina para triplicar los pocillos para un control positivo.

Añadir 2 µl del inhibidor potencial de tirosinasa para triplicar los pocillos.

25 Añadir 98 µl de solución de trabajo de enzima tirosinasa a cada pocillo, excepto a los ensayos en blanco. Mezclar los compuestos con la enzima pipeteando arriba y abajo dos veces o formando vórtices brevemente.

Añadir 100 µl/pocillo de sustrato de L-tirosina.

Elegir el ajuste cinético en el lector de placas SpectraMax 250 y registrar las lecturas de absorbancia a 475 nm cada minuto durante 1 hora.

30 Calcular la pendiente para los controles y los compuestos de ensayo utilizando el software de adquisición de datos.

El porcentaje de inhibición de tirosinasa se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{(\text{prom. pendiente de control vehículo} - \text{prom. pendiente de muestra}) \times 100}{\text{prom. pendiente de control vehículo}}$$

35 Utilizando de forma general el ensayo arriba esbozado, la FSF inhibió la actividad de tirosinasa como se muestra en la Tabla 14 siguiente.

Tabla 14

Concentración (p/v%)	Inhibición de tirosinasa
1%	60%
0,5%	64%
0,25%	73%
0,125%	77%

40 Aunque no implica necesariamente un resultado *in vivo* con respecto a las manchas faciales hiperpigmentadas en humanos en vista de variables tales como las complejidades de la producción de melanina y la transferencia dentro de la piel y la capacidad de penetración en la piel de un compuesto de ensayo, este ensayo demuestra una capacidad de los materiales tales como la FSF para influir potencialmente en la actividad de la tirosinasa.

Ejemplos 8: Ensayo *in vivo* en cuanto a la reducción de manchas hiperpigmentadas y la uniformidad de la melanina

Se realizó un estudio *in vivo* de 9 semanas utilizando un diseño interlaboratorio, controlado por vehículo, de cara dividida, que incluía un periodo de normalización de 1 semana con 270 sujetos. Los sujetos se cribaron según criterios de inclusión/exclusión, que incluían los siguientes:

Inclusión

- 5 • Tiene manchas hiperpigmentadas alrededor de la mejilla y/o el área periorbitaria en ambos lados de la cara.
- Tiene al menos 1 mancha hiperpigmentada de 8-10 mm de diámetro, 4 manchas de 4-6 mm o 10 manchas de 2-3 mm de diámetro (manchas causadas por el sol, pecas o manchas de melasma) o un área de manchas equivalente en el área de la mejilla a cada lado de su cara.
- 10 • Está dispuesto a no exponerse al sol utilizando una loción UV suministrada y filtros UV físicos, tales como un sombrero, para evitar quemaduras solares en la cara, un bronceado o quemaduras causadas por el viento.

Exclusión

- Se le ha diagnosticado atopia, eccema, psoriasis u otras enfermedades crónicas de la piel.
- 15 • Tiene síntomas obvios de una enfermedad de la piel facial (por ejemplo más de 5 granos, áreas de piel descamada roja, vasos sanguíneos delgados superficiales, etc.).
- Tiene áreas considerables de descoloración o cicatrización en la cara.
- Tiene más de 3 lunares prominentes (< 3 mm) en la cara.

Para el estudio se reclutaron doscientos setenta sujetos. Aproximadamente 60 sujetos se retiraron durante el curso del estudio. Cada sujeto recibió dos formulaciones de ensayo codificadas para dos aplicaciones diarias en cada mitad de la cara. Se captaron imágenes de los lugares de tratamiento facial en la base de referencia (semana 0) y después de 4 y 8 semanas de tratamiento y se analizaron las mismas en cuanto a cambios en el color de la piel y el tamaño y el color de las manchas. Las formulaciones de producto incluían un control de vehículo, el vehículo + 0,55% de FSF, y el vehículo + 5% de compuesto de vitamina B3 (niacinamida).

Para reunir las imágenes de los sujetos y analizarlas se utilizó un análisis intracutáneo espectrofotométrico sin contacto (SiaScopy, Aston Clinica, RU). En el método se utilizaron una cámara digital (por ejemplo Fuji S2 digital SLR) como espectrómetro de marca y una fuente de luz de flash (por ejemplo, fuente de luz de flash Sigma Super) para obtener información sobre los cromóforos faciales. Delante de la cámara y la fuente de luz se colocó un filtro con polarización cruzada para eliminar la reflexión especular.

El mapeo de cromóforos de la concentración y distribución de eumelanina (melanina) y oxihemoglobina produce mapas de concentración en escala de grises de cada uno de estos cromóforos. Puede utilizarse un software de análisis de imágenes, tal como Optimas 6.5, para seleccionar una región de interés en cada mapa de cromóforos, de la que se calculan los valores medios de escala de grises y la fracción del área de manchas. La fracción del área de manchas se refiere al área total ocupada por manchas de melanina como porcentaje de la zona total de interés. En los documentos EP 1,810,614 y "The Distribution of Melanin in Skin Determined In Vivo", British Journal of Dermatology, 2007, pp. 620-628, puede encontrarse una descripción de un tipo de mapeo de cromóforos.

La FSF fue la que mejores resultados dio después de 4 semanas, reduciendo las manchas hiperpigmentadas considerablemente mejor ($p \leq 0,10$) que el control y que las composiciones con un 5% de vitamina B. Después de 8 semanas, la composición de vitamina B3 fue la que mejores resultados dio, aunque la composición de FSF era también considerablemente mejor que el control en cuanto a reducir las manchas hiperpigmentadas. La Tabla 16 resume los datos de análisis de las imágenes, siendo FAM la fracción del área de manchas media y siendo Δ FAM el cambio medio en la fracción del área de manchas a partir de la base de referencia (semana 0).

Tabla 16

Tratamiento	NC2 FAM				Uniformidad de melanina			
	Vehículo		Nia		Vehículo		Nia	
	4 sem.	8 sem.	4 sem.	8 sem.	4 sem.	8 sem.	4 sem.	8 sem.
Niacinamida (Nia)	ns	Sig p=0,0004			ns	Sig p=0,0027		
0,55% FSF	ns	Sig p=0,0402	ns	ns	ns	Dir p=0,1702	ns	ns

45 Abreviaturas utilizadas: FAM = fracción del área de manchas; sig = significativo ($p < 0,1$); dir = direccional ($0,1 < p < 0,2$) tendencia = ($0,2 < p < 0,3$) ns = no significativo ($p > 0,3$).

La FSF fue considerablemente mejor que el vehículo en cuanto al FAM y direccionalmente mejor que el vehículo en cuanto a la uniformidad de melanina.

MÉTODOS ANALÍTICOS

50 Para determinar diversas propiedades físicas y químicas mencionadas en los ejemplos se utilizan los siguientes métodos analíticos.

Método para la determinación de la materia seca

El nivel (porcentaje) de materia seca se determinó comparando el peso de la muestra líquida con el peso del residuo seco una vez evaporados los componentes líquidos. En el procedimiento se utilizaron platillos tarados de aluminio desechables, Ohaus Explorer E00640 balance de Ohaus Corporation (Pine Brook, Nueva Jersey), y un horno Shel Lab model 1400E de VWR (West Chester, Pensilvania). Las muestras se secaron durante 12 horas en el horno, ajustado a 105°C. El peso de la tara se restó del peso de la tara que contenía la muestra líquida para obtener el peso "en fresco". El peso de la tara se restó del peso de la tara que contenía la misma muestra después del secado para obtener el peso "en seco". El nivel de materia seca es entonces igual al peso "en seco" dividido por el peso "en fresco", multiplicado por 100%.

10 *Método para la determinación del color*

El color (escala Gardner de 0 a 18) se determinó utilizando un dispositivo Lovibond Comparator 3000 (Tintometer Limited of Salisbury, RU), comparando el color del artículo de ensayo en un tubo de vidrio transparente con estándares de vidrio coloreado insertados en las dos ruedas del dispositivo, según el procedimiento estándar para el dispositivo de acuerdo con el manual de instrucciones.

15 *Método para la determinación de la osmolalidad*

La osmolalidad se determinó midiendo la reducción del punto de congelación de una solución en comparación con el punto de congelación del disolvente puro. Esta medición se llevó a cabo en un Advanced Model 3250 Single-Sample Osmometer de Advanced Instruments, Inc. (Norwood, MA) según el procedimiento estándar para el dispositivo de acuerdo con el manual de instrucciones.

20 *Método para la determinación del índice de refracción*

El índice de refracción se midió en un refractómetro Arias 500 de Reichert Analytical Instruments (Depew, NY) con una bomba de circulación controlada por temperatura exterior conectada, según el procedimiento estándar para el dispositivo de acuerdo con el manual de instrucciones.

Método para mediciones de parámetros de espectros UV

25 Los picos, los senos y las inflexiones en los espectros de absorbencia UV se determinaron mediante un espectrofotómetro Ultrospec 4300 pro UV / Visible de Biochrom Ltd. (Cambridge, Reino Unido) con un soporte de células con camisa de fluido y una bomba de circulación controlada por temperatura exterior conectada. Para la muestra diluida con agua desionizada se utilizaron cubetas de cuarzo con 1 cm de longitud del camino óptico. El control del instrumento y el análisis de datos los proporcionó la aplicación Wavescan de la serie de software SWIFT II de Biochrom Ltd.

30 *Método para la determinación de la actividad de inhibición de elastasa*

La actividad de inhibición de elastasa se determinó mediante un ensayo colorimétrico cinético adaptado para el uso con placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning 3641) de Corning Incorporated (Corning, NY) y un lector de microplacas Synergy 2 de BioTek Instruments, Inc. (Winooski, VT). La actividad enzimática a la hora de escindir el sustrato venía indicada por el desarrollo de un color amarillo medido como aumento de la absorbencia a 410 nm de longitud de onda. El sustrato de N-metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (EPC FH237) y la elastasa (EPC SE563) se obtuvieron de EPC (Elastin Products Company, Inc., Owensville, MO). El volumen de reacción en cada pocillo fue de 200 microlitros, con una concentración de elastasa igual a 0,87 unidades/ml y de sustrato igual a 363 µM. Este procedimiento se había adaptado del método titulado "Assay with N-MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (EPC No. FH237) as substrate" de la página 84 de Elastin Products Company, Inc. Research Biochemicals Catalogue (2004, 92 páginas).

Método para la determinación de la actividad de inhibición de la ciclooxigenasa-2

45 La actividad de inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) se determinó mediante un Cayma Chemicals COX inhibitor screening ELISA assay kit 560131.

Método para la determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó mediante un ensayo CARO, utilizando una adaptación del método descrito en la nota de aplicación "Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assays with Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader" de BioTek, disponible en (www.biotek.com/resources/docs/ORAC_Assay_Application_Note.pdf), para el uso con el lector de microplacas Synergy 2 de BioTek Instruments, Inc. (Winooski, VT). En este ensayo, el AAPH (2,2'-azobis-2-aminopropano) genera especies de oxígeno reactivo que dañan la muestra fluorescente (fluoresceína sódica). Los antioxidantes tales como el éter metílico de (R)-Trolox impiden o hacen más lento este daño, y sus efectos pueden cuantificarse mediante mediciones de la fluorescencia. Las lecturas de fluorescencia se tomaron con una longitud de onda de excitación ajustada a 485 nm y una longitud de onda de emisión ajustada a 528 nm, con un volumen de reacción de 200 microlitros, una concentración de AAPH de 55 mM, una

concentración de fluoresceína sódica de 1,33 μM y un intervalo de concentración de éter metílico de (R)=Trolox entre 80 μM y 2 μM . La fluoresceína sódica (Fluka 46960), el AAPH (Sigma 440914) y el éter metílico de (R)-Trolox (Fluka 93509) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se calcularon valores ABC (área bajo la curva) como suma de proporciones (lectura de fluorescencia actual para el pocillo dividida por la primera lectura de fluorescencia para el pocillo). El promedio de los valores ABC de los pocillos con agua desionizada se restó del ABC de los pocillos con éter metílico de (R)-Trolox y los pocillos con artículos de ensayo, para obtener el ABC correspondiente a la conservación de la fluorescencia mediante antioxidantes. Se generó una curva de calibrado como función de una ABC relacionada con antioxidante de pocillo, que mostraba una actividad CARO equivalente en peso de éter metílico de (R)-Trolox. A continuación se calculó la actividad CARO para los artículos de ensayo como unidades de peso de artículo de ensayo necesarias para lograr un efecto antioxidante igual al producido por 1 unidad de peso de éter metílico de (R)-Trolox.

Método para la determinación de la actividad de barrido

La actividad de barrido de radicales libres, es decir la actividad de barrido de radicales libres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), se determinó mediante un ensayo colorimétrico cinético adaptado para el uso con placas de microtitulación de 96 pocillos de polipropileno revestidas de vidrio (número de catálogo 400 062) de SUN-SRi (Rockwood, TN) y un lector de microplacas Synergy 2 de BioTek Instruments, Inc. (Winooski, VT). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 515 nm. El volumen de reacción en cada pocillo de microplaca fue de 200 microlitros, con una concentración inicial de DPPH igual a 114 μM . Como control positivo se utilizó ácido L-ascórbico. El DPPH (Sigma D9132) y el ácido L-ascórbico USP (Sigma A-2218) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (ST. Louis, MO). La estequiometría de la reacción se calculó y se expresó como unidades de peso del artículo de ensayo necesarias para desactivar 1 unidad de peso de DPPH. Este método se había adaptado del procedimiento descrito en el artículo "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity" de W. Brand-Williams et al, publicado en LWT - Food Science and Technology, volumen 28, 1ª edición, 1995, pp. 25-30.

25 Procedimiento para ensayo de estabilidad rápido utilizando perfiles de temperatura

A continuación se indica un procedimiento para un ensayo de estabilidad rápido utilizando perfiles de temperatura:

- 30 1. Encender 12 bloques de calefacción y calentar a las temperaturas indicadas y encender una nevera y mantenerla a la temperatura indicada, durante al menos 4 horas antes de realizar el experimento. Además de las 12 muestras colocadas en los bloques de calefacción, una muestra se dejará a temperatura ambiente y otra se refrigerará para proporcionar un total de 14 temperaturas diferentes. Las temperaturas son 5, temperatura ambiente (-23C), 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72 y 75°C. Los bloques de calefacción están equipados con bloques de inserción de aluminio fresados para adecuarlos a viales de 20 ml; estos bloques de inserción caben dentro de los bloques de bolsillo calentados de los bloques de calefacción. Cada bloque de calefacción debería tener controladores de temperatura y sensores de temperatura independientes y proporcionar un control de las temperaturas del bloque de reacción con 0,1°C de regulación.
- 35 2. Llenar 14 viales con tan poco espacio de aire como sea posible. El tamaño de los viales puede oscilar entre el de los viales de muestreador automático y el de los viales de centelleo, siempre que todos sean del mismo tamaño. Para los fines de este ejemplo se utilizan viales de 20 ml.
- 40 3. Preparar una etiqueta para cada vial con referencia al libro de notas y temperatura. Es mejor hacer las etiquetas tan pequeñas y estrechas como sea posible. Hacer una etiqueta de más sin temperatura para mostrarla con los viales si se ha de evaluar el color con una fotografía en color.
- 45 4. Pegar cada etiqueta al vial correspondiente sin tapar la vista del producto en el vial. Normalmente, esto se realiza aplicando la etiqueta a la tapa y produciendo una lengüeta vertical larga que se lee de arriba abajo. Poner la etiqueta en el lado de la tapa opuesto al de cualquier marca existente en el vial, de manera que cuando se hagan las fotografías puedan mostrarse las etiquetas con la mejor vista de la muestra en el vial.
- 50 5. Si se ha de evaluar el color, hacer una fotografía inicial de las muestras con una cámara digital. Poner las muestras en fila de izquierda a derecha desde la temperatura más baja hasta la más alta, de manera que la muestra pueda verse claramente en el vial (girar el vial de modo que ninguna etiqueta o impresión existente en el vial tape la vista). Mostrar la etiqueta de más de manera que pueda leerse fácilmente en la imagen. Para una mayor coherencia, hacer una marca en la mesa de laboratorio para la posición de los viales y la cámara, de modo que posteriormente sea posible reproducir su geometría. Se recomienda apagar el flash.
- 55 6. Hacer las fotografías de las maneras siguientes para estos tipos de muestra:
 - a. Soluciones transparentes: contra un fondo blanco, utilizar un flash y ninguna lámpara de escritorio
 - b. Muestras opacas: contra un fondo negro, apagar el flash y utilizar una lámpara de escritorio
7. Si se ha de realizar un análisis químico, muestrear cada vial para una lectura inicial.
8. Colocar las muestras en los bloques de calefacción y en la nevera registrando la fecha y la hora.

9. En el punto temporal elegido (por defecto, utilizar 3, 7 y 14 días), retirar las muestras de los bloques de calefacción y de la nevera y dejar que adquieran la temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.
10. Si se ha de evaluar el color, hacer una nueva fotografía utilizando las marcas para las posiciones de los viales y la cámara realizadas en el paso 4. Repetir esta operación en todos los puntos temporales.
- 5 11. Si se ha de realizar un análisis químico, muestrear cada vial en este momento. Repetir para cada punto temporal.
12. Para evaluar el color, escoger el punto temporal que mejor distinga entre diferentes productos y cortar y pegar juntas las fotografías etiquetando cada producto. Las líneas que representan el tiempo equivalente a 6 meses y 1 año a temperatura ambiente pueden dibujarse en la imagen utilizando la tabla de estabilidad.
- 10 Encontrar la temperatura acelerada correspondiente a 6 meses y 2 años en la tabla en un punto temporal determinado y esto determina entre qué viales debe dibujarse la línea (véase por ejemplo la Figura 10).
13. Para un análisis químico, representar gráficamente la concentración con respecto a la temperatura para cada punto temporal. Dibujar una línea uniforme a través de los datos y registrar la temperatura a la que se haya alcanzado el umbral inaceptable. Relacionar esta temperatura con el tiempo en la tabla de estabilidad para obtener la temperatura ambiente equivalente. Esta técnica puede aplicarse al análisis de color si se mide el color con un colorímetro de laboratorio y se representa gráficamente la diferencia de color en lugar de la concentración.
- 15 14. La tabla de estabilidad supone una energía de activación de 25 kcal/mol. La mayoría de las hidrólisis y reacciones similares tienen aproximadamente esta energía o más. Si la energía es mayor, el producto será más estable y la tabla predecirá que la estabilidad a temperatura ambiente es menor de lo que realmente es (un cálculo prudente en exceso). A veces, la energía es menor que este valor. Por este motivo, si se está efectuando un análisis químico, se recomienda tomar los datos arriba generados y calcular las energías de reacción utilizando un gráfico de Arrhenius para confirmar que las suposiciones sean correctas.
- 20 15. Apéndice: Extracción de colores de laboratorio de las fotografías:
- 25 i. Transferir todas las fotografías a un CD. Medir el color de laboratorio medio de cada muestra utilizando un ordenador equipado con software de medición de color, tal como Optimas, y cualesquiera periféricos necesarios.
- 30 ii. Comenzar con la muestra de 5C situada más a la izquierda y, moviendo desde la esquina superior derecha y arrastrando hacia la inferior izquierda, seleccionar el área del vial en la que se ha de sacar el promedio de color. Poner la muestra de 5C como referencia estándar (hacer esto sólo inicialmente con la muestra de 5C).
- iii. Registrar el valor L, a, b, Std Dev y dEcmc para cada muestra de temperatura. Registrar el blanco de referencia para cada fotografía (debería ser 255,255,255).
- 35 No debe entenderse que las dimensiones y los valores aquí descritos están estrictamente limitados a los valores numéricos exactos indicados. En su lugar, a no ser que se especifique otra cosa, cada una de tales dimensiones está destinada a significar tanto el valor indicado como un intervalo funcionalmente equivalente alrededor de dicho valor. Por ejemplo, una dimensión descrita como "40 mm" está destinada a significar "aproximadamente 40 mm".

Reivindicaciones

1. Procedimiento para preparar una composición de fracción de suero celular de *Ficus*, comprendiendo dicho procedimiento:
 - a. separar jugo celular de *Ficus* de hojas de *Ficus* limpias, frescas y no marchitadas para obtener jugo celular de *Ficus* fresco, no añadiéndose ningún líquido exógeno antes de dicha separación o durante la misma;
 - b. filtrar dicho jugo celular de *Ficus* fresco para obtener jugo celular libre de fibras; y
 - c. fraccionar dicho jugo celular libre de fibras con el fin de obtener la fracción de suero de *Ficus*, comprendiendo dicho fraccionamiento:
 - 1) eliminar la clorofila de dicho jugo celular libre de fibras para obtener un Sobrenadante I;
 - 2) eliminar pigmentos y proteínas del Sobrenadante I para formar la fracción de suero de *Ficus*; y
 - 3) opcionalmente añadir un estabilizante a dicha fracción de suero de *Ficus*.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha eliminación de pigmentos y proteínas del Sobrenadante I comprende:
 - i. ajustar el pH del Sobrenadante I a aproximadamente 7,5 para formar un Sobrenadante I de pH ajustado;
 - ii. separar el Sobrenadante I de pH ajustado en un Precipitado II y un Sobrenadante II;
 - iii. ajustar el pH del Sobrenadante II a aproximadamente 3,6 para formar un Sobrenadante II de pH ajustado;
 - iv. separar el Sobrenadante II de pH ajustado en un Precipitado III y la fracción de suero de *Ficus*.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho estabilizante se selecciona del grupo consistente en antioxidantes, agentes quelantes, conservantes y mezclas de los mismos.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho estabilizante se selecciona del grupo consistente en metabisulfito de sodio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, metilparabeno sódico, pentilenglicol y mezclas de los mismos.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas hojas de *Ficus* se seleccionan del grupo de especies de *Ficus* consistente en *F. benghalensis*, *F. carica*, *F. elastica*, *F. microcarpa*, *F. trigonata* y combinaciones de las mismas.
6. Composición obtenida según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Composición según la reivindicación 6, caracterizada porque dicha fracción de suero de *Ficus* tiene una actividad biológica capaz de reducir la hiperpigmentación de la piel.
8. Composición según la reivindicación 6, caracterizada porque dicha composición está esencialmente libre de feoforbidos.
9. Composición según la reivindicación 6, caracterizada porque dicha composición está esencialmente libre de proteínas según se mide por el método de Kjeldahl.
10. Composición según la reivindicación 6, caracterizada porque dicha composición es soluble en agua.
11. Composición según la reivindicación 6, caracterizado porque dicha composición tiene un valor de color Gardner de menos de 8, preferiblemente menos de 7,5.

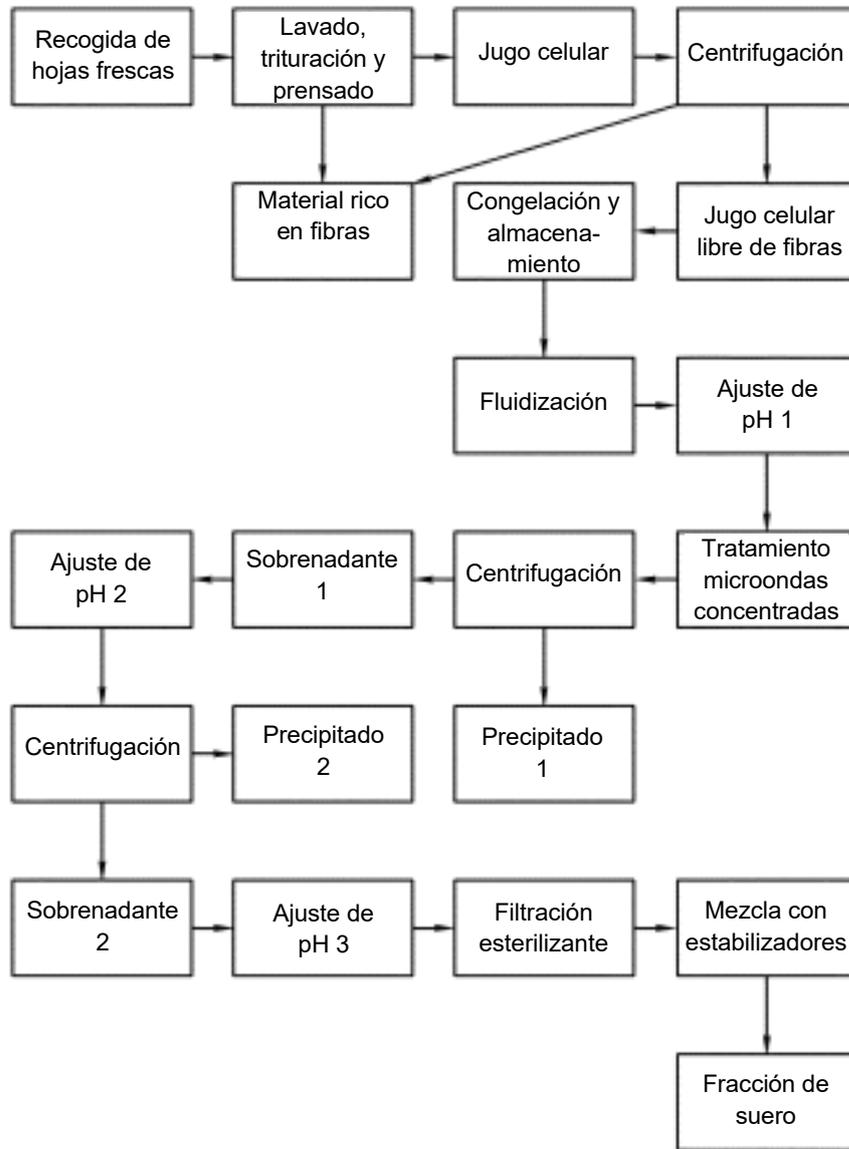
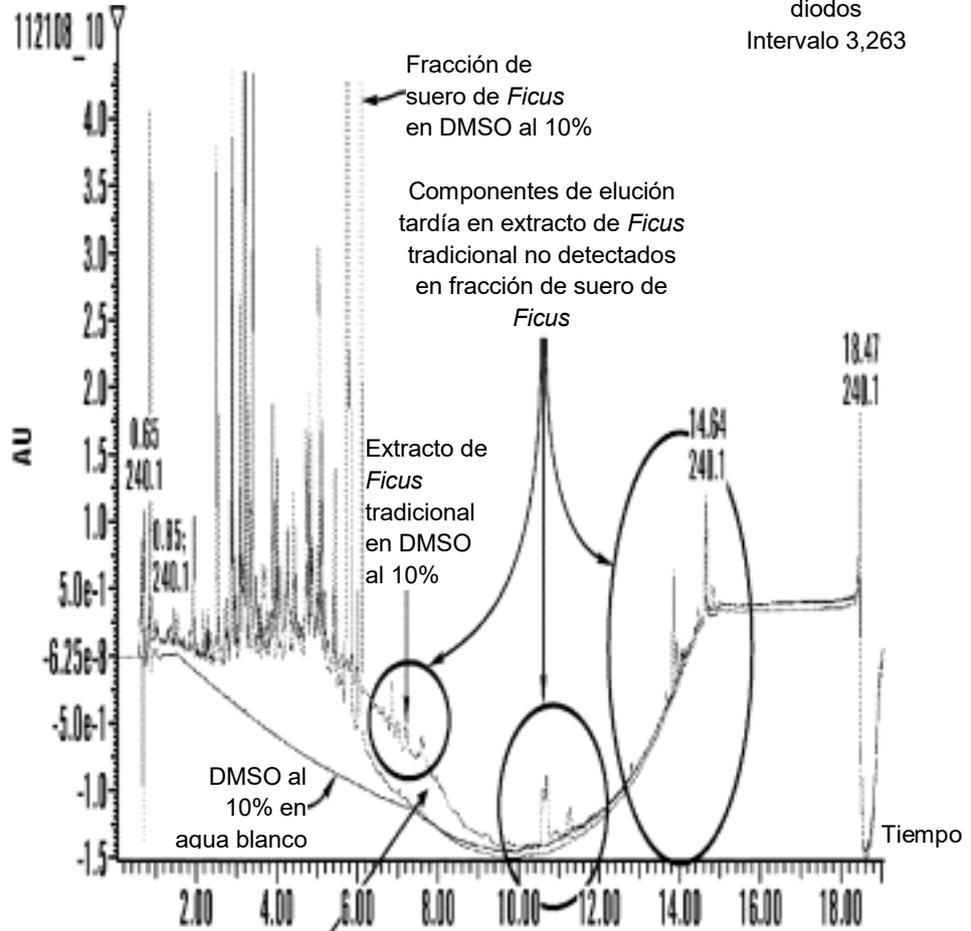


FIG. 1

Cromatogramas CL/UV 240-500 nm

DMSO al 10% blanco neg

Ordenación de 2 diodos
Intervalo 3,263



Mayor "base de referencia" para extracto de *Ficus* tradicional en comparación con fracción de suero de *Ficus*

FIG. 2

Compuestos pigmentarios detectados sólo en extracto de *Ficus* tradicional

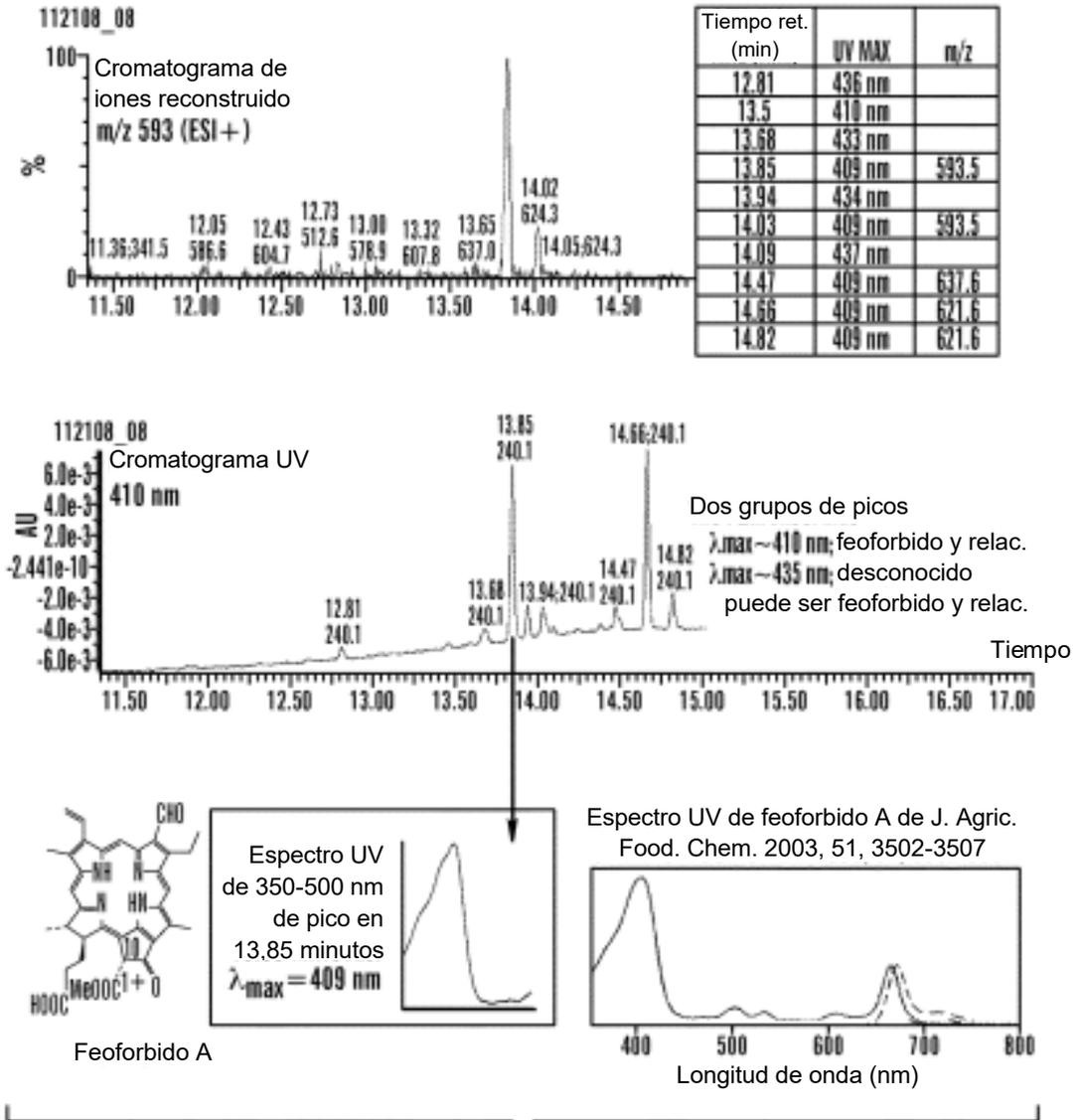


FIG. 3

Cromatogramas CL/UV 350 nm

Ordenación de 2 diodos
350
intervalo 7,936e-2

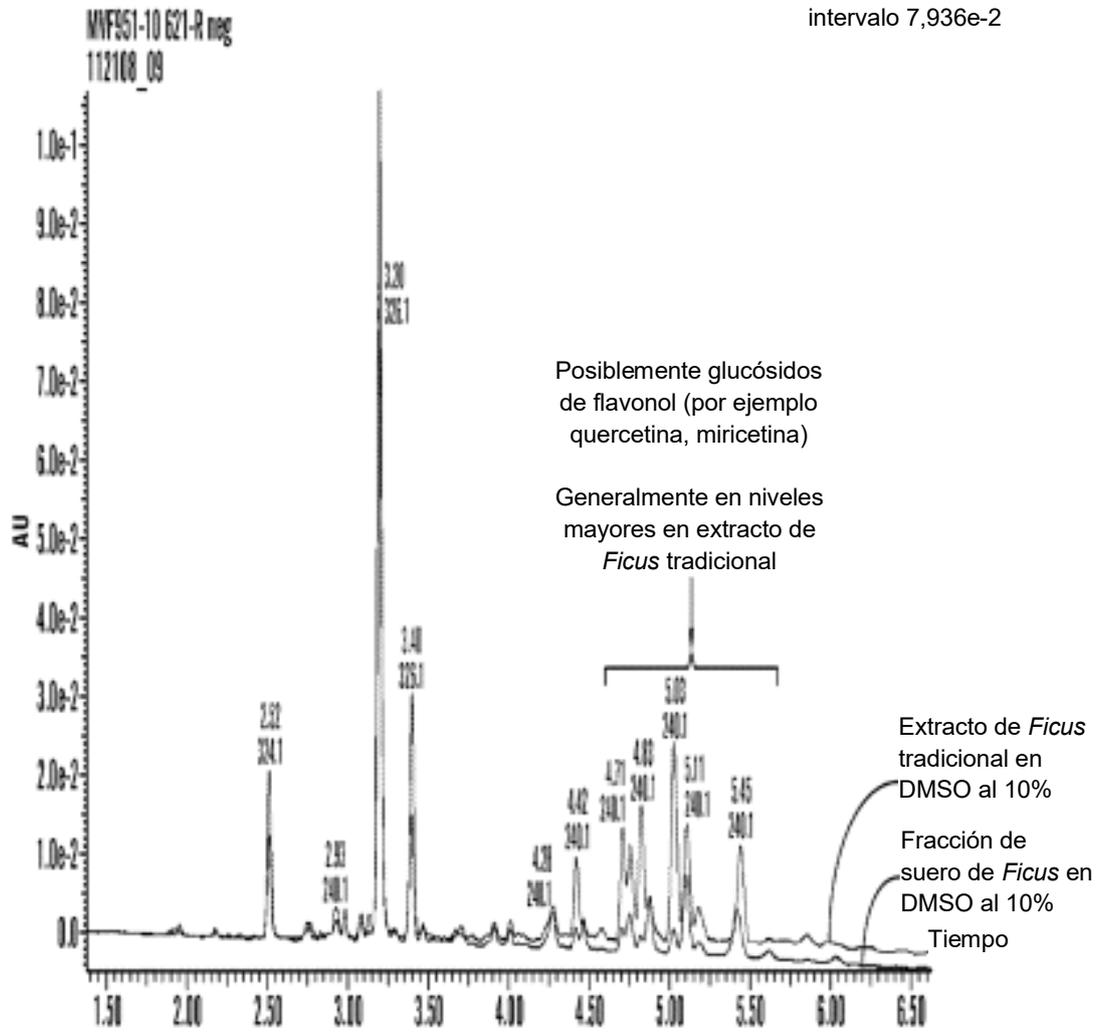


FIG. 4

La fracción de suero de *Ficus* contiene mayores niveles de catequina y oligómeros de catequina (es decir taninos condensados o proantocianidinas)

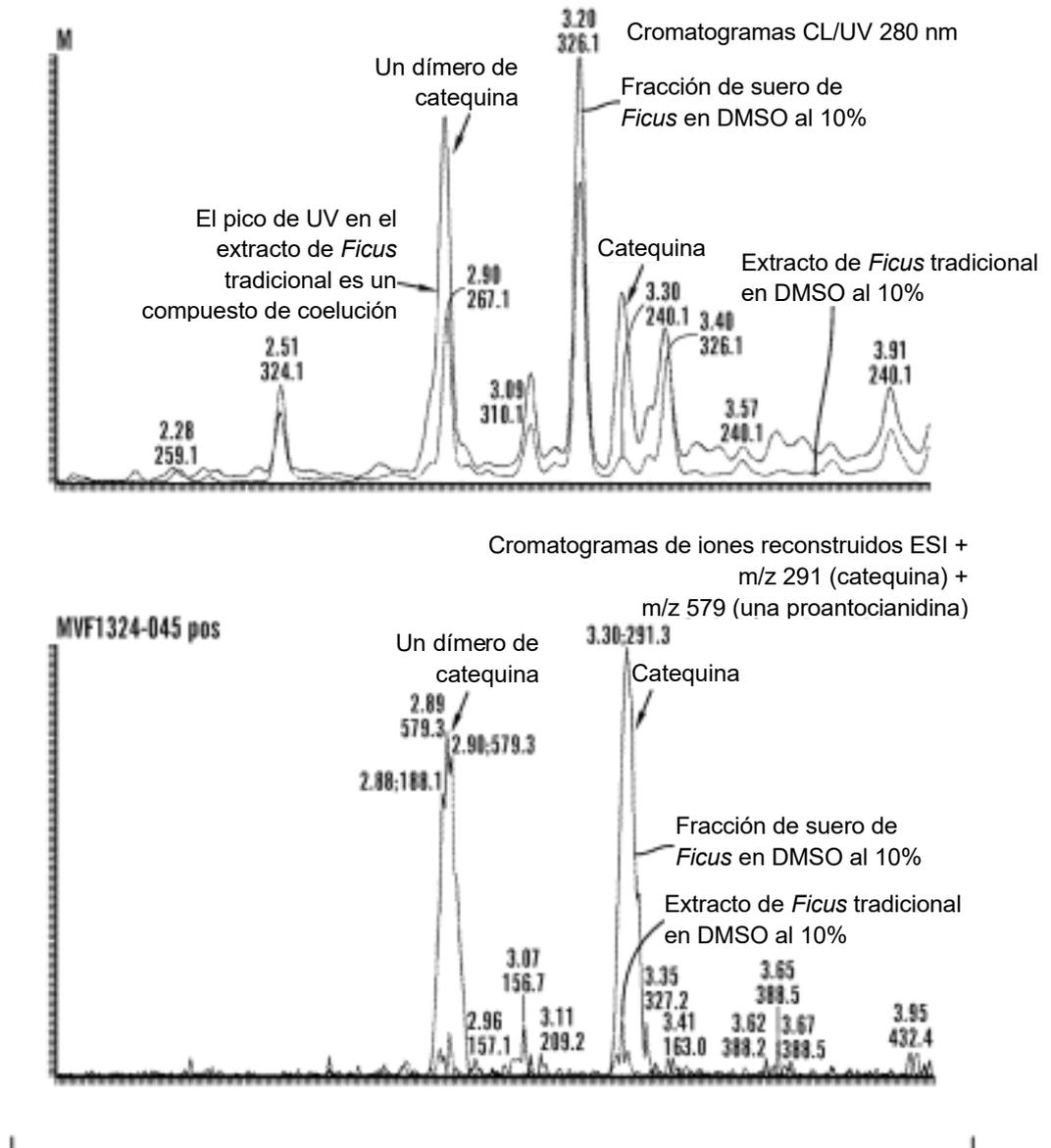


FIG. 5

Niveles de ácido clorogénico en esencia no diferentes entre los dos extractos

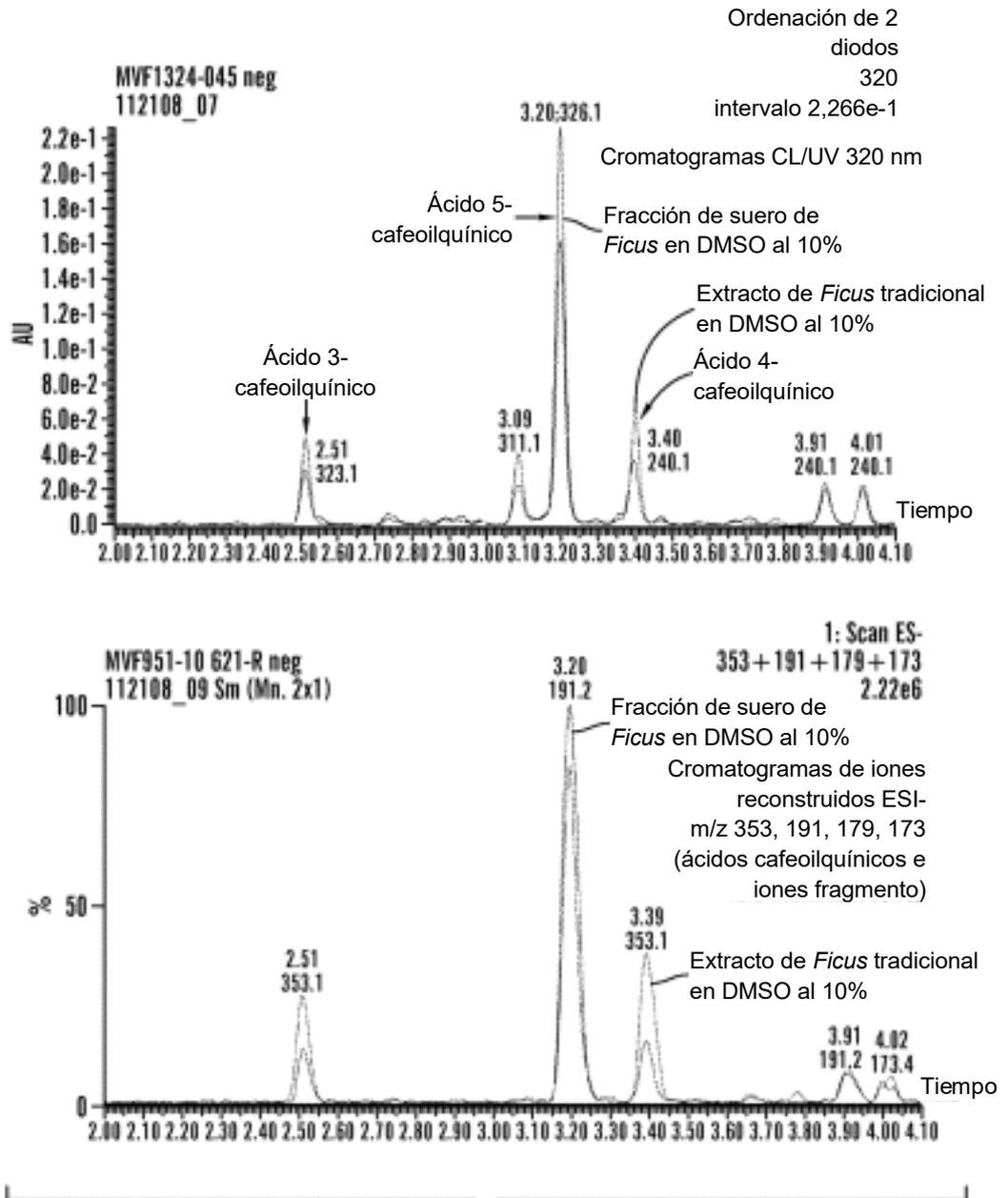


FIG. 6

Cromatogramas de iones reconstruidos ESI+
 m/z 182, 165 (tirosina) + m/z 166 (fenilalanina) + m/z 205, 188 (triptófano)

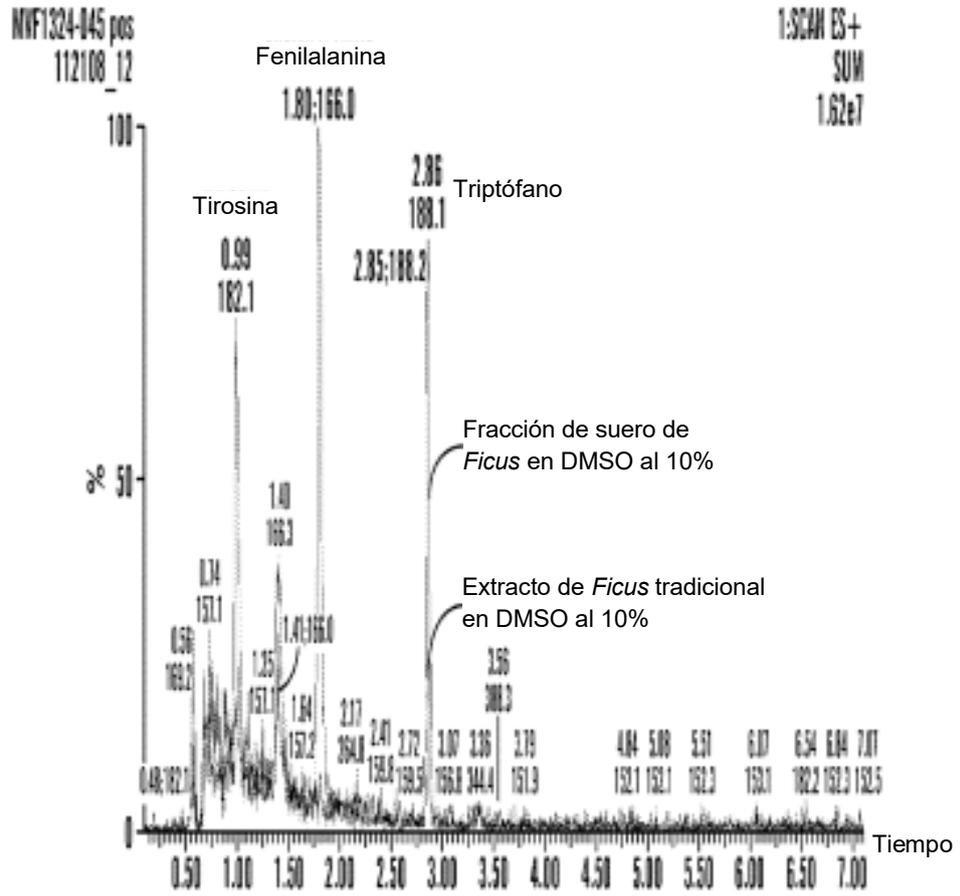


FIG. 7

Estabilidad de color acelerada de 14 días

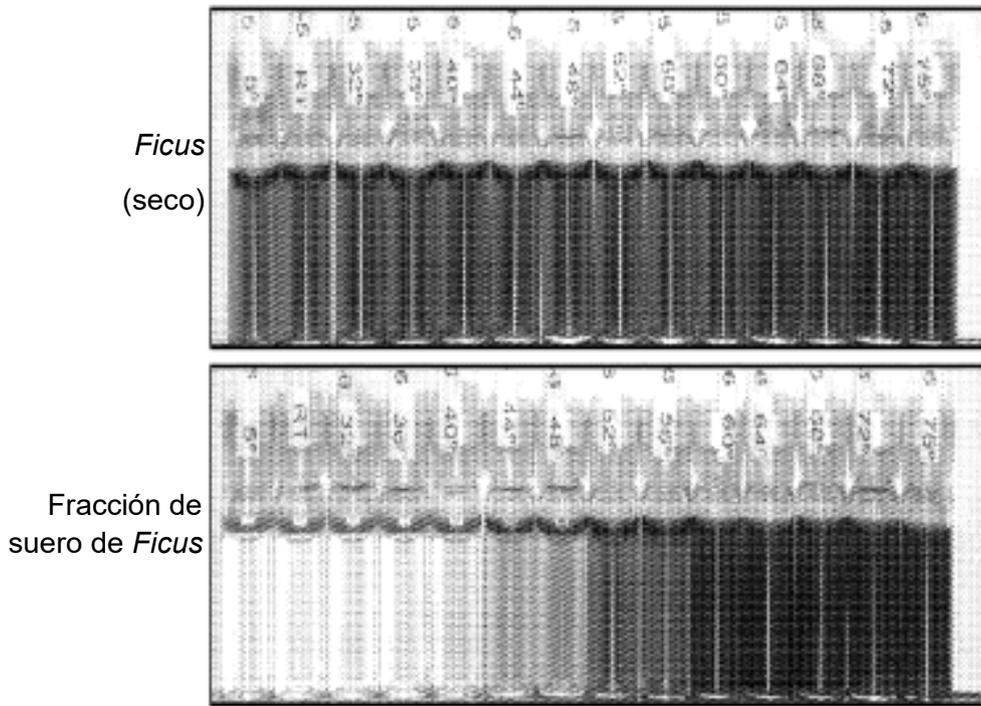


FIG. 8

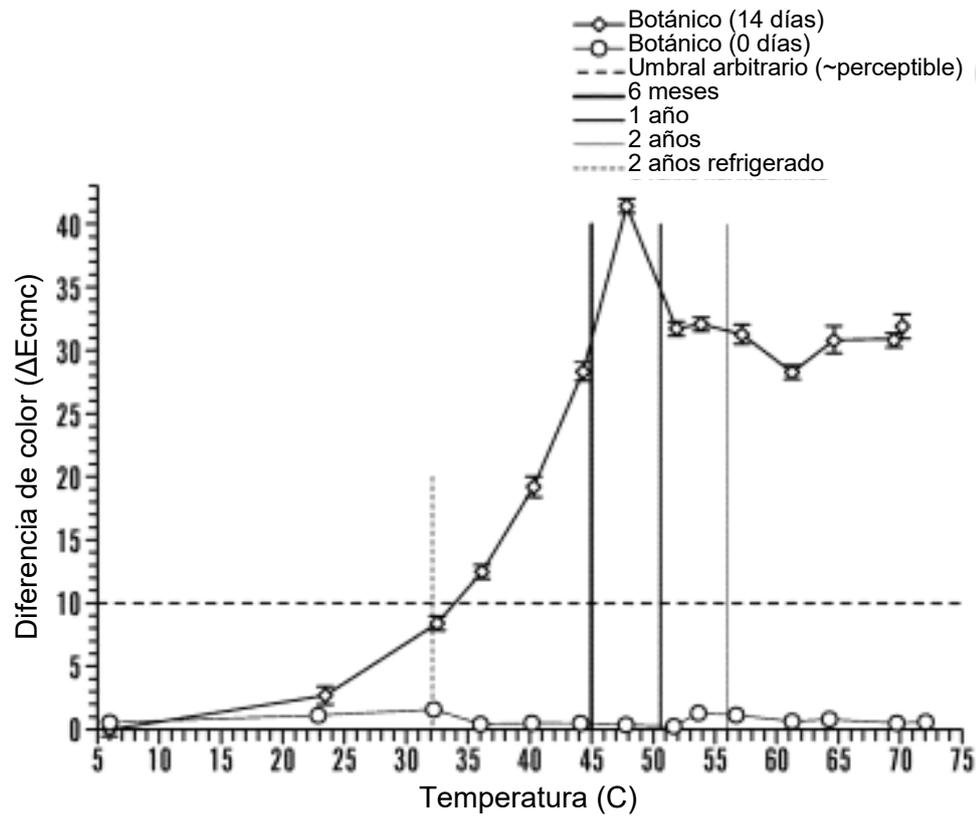


FIG. 9

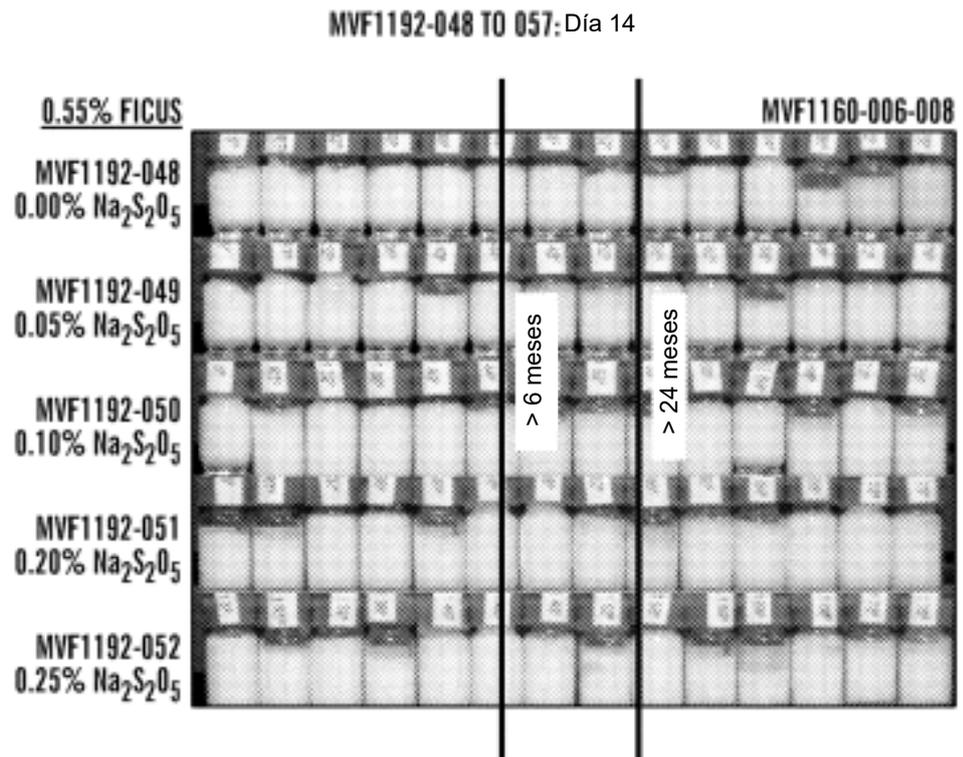


FIG. 10