

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 917**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97	(2007.01)
A61K 36/704	(2006.01)
A61K 31/519	(2006.01)
A61Q 17/00	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)
A61P 17/00	(2006.01)
A61P 31/10	(2006.01)
A61K 8/49	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2012 PCT/JP2012/056598**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12124743**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2012 E 12757148 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2700406**

54 Título: **Procedimiento para producir un extracto de hojas de planta de índigo**

30 Prioridad:

14.03.2011 JP 2011055942

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2018

73 Titular/es:

**SUNSTAR INC. (100.0%)
3-1 Asahi-machi
Takatsuki-shi, Osaka 569-1195, JP**

72 Inventor/es:

**KUSAKARI, TAKASHI y
YAMASHITA, KENTARO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 653 917 T3

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

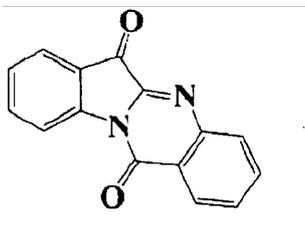
DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir un extracto de hojas de planta de índigo.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un extracto de hojas de la planta de índigo que contiene triptantrina, a un extracto respectivo obtenido mediante dicho procedimiento, y a una composición cosmética que lo comprende.

10 Las hojas de plantas de índigo (hojas de plantas de índigo) contienen indicano (a partir del que se obtiene el índigo). Por lo tanto, las hojas se han usado preferentemente como material de partida para producir un colorante azul por todo el mundo. Actualmente, los colorantes de índigo sintetizados químicamente se usan a menudo en la industria; sin embargo, las hojas de las plantas de índigo todavía se hacen crecer para su utilización como colorante.

15 En particular, es conocido que las hojas de *Polygonum tinctorium*, que es una planta de índigo que crece predominantemente en Japón, contienen diversos ingredientes útiles, además de indicano. Por ejemplo, se sabe que las hojas de esta planta de índigo contienen una gran cantidad de triptantrina (fórmula estructural representada a continuación).



20 Triptantrina

25 Se ha dado a conocer que la triptantrina presenta una acción antibacteriana frente a hongos del género *Malassezia*, y por lo tanto es eficaz frente a dermatitis atópica en la que están implicados los hongos del género *Malassezia* (Bibliografía de Patente (PLT) 1). Se ha dado a conocer que la triptantrina tiene un efecto supresor de reacciones alérgicas de tipo IV (Bibliografía de Patente (PTL) 2).

30 De este modo, ha resultado cada vez más evidente que la triptantrina exhibe efectos útiles, particularmente cuando se aplica a la piel, y la demanda de triptantrina está creciendo.

35 Como procedimiento para extraer triptantrina a partir de una planta de índigo, se conoce la extracción a partir de una planta de índigo usando un disolvente orgánico. Por ejemplo, se conoce un procedimiento de extracción que usa diclorometano como agente extrayente (Bibliografía de Patente (PTL) 1), y un procedimiento que usa 1,3-butilenglicol o similar como agente extrayente. (Se puede extraer muy poca triptantrina con agua).

40 En este contexto, el documento JP 2005 281253 A describe un cosmético para la piel que comprende un polímero, un (met)acrilato de alquilo y un extracto en términos de un residuo seco obtenido extrayendo *Polygonum tinctorium*. Además, el documento JP 2001 031581 A describe un extracto preparado sumergiendo *Polygonum tinctorium* reciente en un disolvente orgánico para extraer un componente soluble en acetato de etilo y recoger el componente. Además, el documento JP 2009 149596 A describe un procedimiento para extraer componentes tales como triptantrina a partir de hojas de índigo usando irradiación de microondas. Además, el documento EP 1 894 558 A1 describe un agente para la aplicación externa a la piel que contiene un extracto de planta de índigo.

45 Sin embargo, es probable que la utilización de un disolvente orgánico dé como resultado la extracción de un ingrediente altamente irritante. Por lo tanto, dependiendo del tipo de disolvente usado, el extracto obtenido puede ser inadecuado para la aplicación a la piel, o puede contener triptantrina en un estado inestable. Todavía no se ha desarrollado ningún procedimiento de extracción que sea adecuado para la aplicación a la piel. Otro problema es que la triptantrina tiene fundamentalmente una mala estabilidad a la luz.

Bibliografía de Patente

55 PTL 1: JP2004-189732A

PTL 2: JP2006-241080A

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir un extracto de hojas de

planta de índigo que contiene triptantrina, que es particularmente adecuado para la aplicación a la piel.

Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que cuando se filtra una mezcla que comprende un extracto de etanol de hojas de planta de índigo y un alcohol polihídrico y se recoge el filtrado, se puede producir un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina que no provoca irritación a la piel (particularmente sin potencial para causar sensibilización a la piel). Los presentes inventores lograron la presente invención con mejoras adicionales sobre la base de este hallazgo.

De este modo, la presente invención incluye los apartados enunciados a continuación.

1. Procedimiento para producir un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina, que comprende:

(i) extraer hojas de planta de índigo con etanol,

(ii) concentrar el extracto de etanol de hojas de planta de índigo,

(iii) mezclar el extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo con un alcohol polihídrico o con un alcohol polihídrico hidratado, y

(iv) filtrar la mezcla del extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y el alcohol polihídrico, y recoger el filtrado.

2. Procedimiento según el apartado 1, en el que la mezcla comprende además agua.

3. Procedimiento según el apartado 1, en el que el alcohol polihídrico es por lo menos un glicol seleccionado de entre el grupo que consiste en 1,3-butilenglicol, propilenglicol, isoprenoglicol, y pentilenglicol.

4. Procedimiento según cualquiera de los apartados 1 a 3, que comprende mezclar el extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo con un alcohol polihídrico hidratado, filtrar la mezcla resultante que comprende el extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y el alcohol polihídrico hidratado, y recoger el filtrado.

5. Procedimiento según cualquiera de los apartados 1 a 4, en el que las hojas de planta de índigo son hojas secadas.

6. Procedimiento según el apartado 5, en el que las hojas de planta de índigo son hojas secadas al sol.

7. Extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina, que se obtiene mediante el procedimiento según uno cualquiera de los apartados 1 a 6.

8. Composición cosmética adecuada para aplicación externa a la piel, que comprende el extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina según el apartado 7.

La triptantrina contenida en el extracto de hojas de planta de índigo obtenido mediante el procedimiento para producir un extracto de hojas de planta de índigo según la presente invención tiene una estabilidad a la temperatura y estabilidad a la luz excelentes. Además, el extracto de hojas de planta de índigo según la presente invención provoca menos irritación a la piel (en particular, sensibilización de la piel) en comparación con extractos de hojas de planta de índigo producidos convencionalmente. Además, el extracto de hojas de planta de índigo tiene una excelente actividad antimicrobiana. Por lo tanto, el extracto de hojas de planta de índigo es adecuado para uso como una composición para aplicación externa a la piel, o para la utilización en la fabricación de composiciones para aplicación externa a la piel.

Además, el procedimiento para producir un extracto de hojas de planta de índigo según la presente invención puede incrementar el contenido de triptantrina del extracto de hojas de planta de índigo obtenido en comparación con los procedimientos convencionales, y también puede ajustar el contenido de triptantrina.

Las figuras representan:

La figura 1 es un diagrama esquemático de un ejemplo del procedimiento para producir un extracto de hojas de planta de índigo que contienen triptantrina según la presente invención.

La figura 2 es un diagrama esquemático de un ejemplo de un procedimiento convencional para producir un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina.

La figura 3 representa los resultados de examinar la estabilidad de triptantrina contenida en un extracto de

Et-BG de planta de índigo que se obtuvo mediante el procedimiento de producción representado en la figura 1.

5 La figura 4 representa los resultados de examinar la estabilidad de triptantrina contenida en un extracto de BG de planta de índigo que se obtuvo mediante el procedimiento de producción representado en la figura 2.

La figura 5 esquematiza los procedimientos para examinar la sensibilización de la piel del extracto de BG de planta de índigo en el ejemplo 1 de ensayo.

10 La figura 6 representa los criterios usados para examinar la sensibilización de la piel de extractos de hojas de planta de índigo en los ejemplos de Ensayo.

15 La figura 7 esquematiza los procedimientos para examinar la sensibilización de la piel de un extracto de Et de planta de índigo y un extracto de Et-BG de planta de índigo en el ejemplo 2 de Ensayo.

La figura 8 representa los resultados de ensayo con respecto a si el contenido de triptantrina del extracto de hojas de planta de índigo obtenido varía dependiendo de la condición de las hojas de planta de índigo.

20 La figura 9 es una gráfica que compara las relaciones de células viables obtenidas cultivando *Staphylococcus aureus* en medios, conteniendo cada uno de ellos uno de los siguientes: un extracto de Et-BG de planta de índigo, un extracto de BG de planta de índigo, un extracto acuoso de planta de índigo, y agua.

La presente invención se explica a continuación con mayor detalle.

25 El procedimiento para producir un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina según la presente invención comprende filtrar una mezcla que comprende un extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y un alcohol polihídrico, y recoger el filtrado. La presente invención incluye además un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina obtenido mediante el procedimiento de producción.

30 Extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo

El extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo se puede obtener concentrando un extracto de etanol de hojas de planta de índigo.

35 El extracto de etanol de hojas de planta de índigo se puede obtener extrayendo hojas de planta de índigo con etanol. El tipo de planta de índigo a partir de la que se recogen hojas de planta de índigo es preferentemente una planta de índigo cuyas hojas contienen triptantrina. *Polygonum tinctorium* es particularmente preferible. Las hojas de planta de índigo a usar son preferentemente hojas secadas. Los ejemplos de hojas de planta de índigo secadas incluyen hojas de planta de índigo liofilizadas, hojas de planta de índigo secadas por calor, y hojas de
40 planta de índigo secadas al sol. La utilización de hojas de planta de índigo secadas al sol es particularmente preferida debido a que el extracto de hojas de planta de índigo obtenido tiene un contenido de triptantrina notablemente elevado. El procedimiento para obtener hojas de planta de índigo secadas no está particularmente limitado. Por ejemplo, las hojas de planta de índigo se pueden secar después de recoger las hojas. Alternativamente, después de que se seca toda la planta, se pueden recoger las hojas. Cuando las hojas se secan al sol, el tiempo de secado se puede seleccionar adecuadamente según las condiciones meteorológicas, etc. Por ejemplo, en septiembre a noviembre, cuando las hojas de planta de índigo se cosechan en Japón, las
45 hojas se pueden secar mediante exposición al sol durante alrededor de 2 a 7 días.

50 El procedimiento de extracción con etanol no está particularmente limitado, y se puede seleccionar adecuadamente de procedimientos conocidos. Por ejemplo, las hojas de planta de índigo se pueden extraer con etanol a reflujo. Más específicamente, por ejemplo, las hojas de planta de índigo y el etanol se pueden colocar en un matraz conectado a un condensador, y se pueden poner a reflujo durante aproximadamente 1 a 6 horas. La cantidad de hojas de planta de índigo a añadir a etanol se puede seleccionar adecuadamente. Por ejemplo, se puede añadir 1 a 10 g de hojas de planta de índigo, en una base de masa seca, a 100 ml de etanol. Aunque se
55 puede usar etanol hidratado (una mezcla de agua y etanol) para la extracción, es preferible un etanol hidratado con un contenido elevado de etanol. Por ejemplo, el etanol hidratado contiene preferentemente etanol en una proporción de 70% en volumen o más, más preferentemente 90% en volumen o más, incluso más preferentemente 95% en volumen o más, y todavía más preferentemente 99% en volumen o más.

60 El extracto de etanol concentrado se puede obtener concentrando un extracto de etanol. El procedimiento para concentrar un extracto de etanol no está particularmente limitado, y se puede seleccionar adecuadamente de procedimientos conocidos. Un procedimiento de concentración preferible puede ser, por ejemplo, destilación a presión reducida. Específicamente, un concentrado de destilación a presión reducida es adecuado como extracto de etanol concentrado. La destilación a presión reducida se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando un
65 concentrador de destilación a presión reducida o un concentrador de destilación a vacío. Aunque el grado de concentración no está particularmente limitado, el extracto de etanol se puede concentrar, por ejemplo, para

eliminar 90% (preferiblemente alrededor de 90 a 99,99%) o más de la masa del extracto. Como se señala anteriormente, la eliminación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante destilación a presión reducida o mediante destilación a vacío. El extracto se puede concentrar, por ejemplo, hasta que la destilación a presión reducida no provoca casi ningún cambio (sin cambio sustancial) en la masa.

5

Alcohol polihidroxilado

Como alcohol polihídrico en la presente invención, se puede usar cualquier alcohol polihídrico que se usa habitualmente para preparaciones externas (tales como cosméticos, cuasi-fármacos, o fármacos externos). Entre los alcoholes polihidroxilados, los alcoholes monohidroxilados o alcoholes dihidroxilados son preferidos. Más específicamente, resulta preferido el glicol o la glicerina. Sus ejemplos específicos incluyen 1,3-butilenglicol, propilenglicol, pentilenglicol (1,2-pentanodiol), glicerol, dipropilenglicol, 1,3-propanodiol, isoprenoglicol (isopentildiol), y similares. Entre estos, son preferibles 1,3-butilenglicol, propilenglicol, pentilenglicol, e isoprenoglicol, y es particularmente preferible 1,3-butilenglicol. Estos alcoholes polihidroxilados se pueden usar de forma individual, o en una combinación de dos o más.

10

15

Mezcla que comprende un extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y un alcohol polihídrico

20

25

La mezcla que comprende un extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y un alcohol polihídrico para uso en la presente invención se puede obtener, por ejemplo, mezclando un extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y un alcohol polihídrico como se describe anteriormente. La relación de mezclamiento del extracto de etanol concentrado al alcohol polihídrico no está particularmente limitada, y se puede seleccionar de forma adecuada. Por ejemplo, la relación másica de extracto de etanol concentrado:alcohol polihidroxilado está preferentemente en el intervalo de 1:16 a 2:1, más preferentemente 1:13 a 1:1, e incluso más preferentemente 1:10 a 1:5.

30

Cuando se usa un extracto de etanol concentrado preparado concentrando un extracto de etanol, y se añade una cantidad relativamente pequeña de un alcohol polihídrico, la cantidad de filtrado obtenida por la etapa de filtración descrita a continuación se puede reducir, proporcionando así una disolución más concentrada de un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina. Esto puede incrementar o ajustar la concentración de triptantrina en el extracto de hojas de planta de índigo en forma de una disolución, y de ese modo mejorar la eficiencia de la extracción.

35

40

45

La mezcla que comprende un extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y un alcohol polihídrico puede contener además agua. La mezcla se puede preparar mezclando un extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y un alcohol polihídrico, y añadiendo posteriormente agua. Como alternativa, la mezcla también se puede preparar mezclando un extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y un alcohol polihídrico hidratado (una mezcla de agua y un alcohol polihídrico). En cualquiera de los casos, la relación de mezclamiento de agua al alcohol polihídrico no está particularmente limitada, y se puede seleccionar de forma adecuada. La relación másica de agua al alcohol polihídrico está preferentemente en el intervalo de 25:75 a 75:25, más preferentemente 40:60 a 60:40, e incluso más preferentemente 45:55 a 55:45. Cuando se usa un alcohol polihídrico hidratado, la relación de mezclamiento de agua al alcohol polihídrico en el alcohol polihídrico hidratado es preferentemente la relación másica descrita anteriormente. Después de que se mezcla un alcohol polihídrico hidratado, se puede añadir agua y/o un alcohol polihídrico o etanol.

50

55

Como se describe anteriormente, el procedimiento para producir el extracto según la presente invención puede comprender las siguientes cuatro etapas:

(i) extraer hojas de planta de índigo con etanol,

(ii) concentrar el extracto de etanol de hojas de planta de índigo,

(iii) mezclar el extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo con un alcohol polihídrico o con un alcohol polihídrico hidratado (y opcionalmente mezclar además agua con él), y

(iv) filtrar la mezcla del extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y el alcohol polihídrico, y recoger el filtrado.

60

Filtración

65

En el procedimiento para producir el extracto según la presente invención, la mezcla se filtra, y el filtrado se recoge. El procedimiento para filtrar la mezcla no está particularmente limitado, y se puede seleccionar adecuadamente de procedimientos conocidos. Por ejemplo, se pueden usar los siguientes, de forma individual o en combinación: filtros, filtros a presión, prensas de filtro, filtros de enfriamiento, filtros de succión, y filtros similares que usan papel de filtro, tela de filtro, un tamiz de alambre trapezoidal, un tamiz de uretano, un filtro de membrana, un filtro de vidrio, etc. Por ejemplo, un procedimiento preferible comprende obtener un filtrado

5 haciendo pasar la mezcla a través de un filtro con tela de filtro (por ejemplo, Leaf Filter o Fundabac Filter), y filtrar posteriormente el filtrado usando un filtro de membrana o un filtro de vidrio. Otro procedimiento preferible puede ser un procedimiento que puede eliminar partículas con un tamaño de partículas de alrededor de 15 µm o más (preferiblemente alrededor de 10 µm o más) mediante filtración, tal como filtración por succión, usando un papel de filtro que puede retener partículas con un tamaño de partículas de alrededor de 10 µm o más (por ejemplo, Qualitative Filter Paper No. 1 producido por Advantech Co., Ltd.).

10 El filtrado obtenido por filtración se puede usar como un extracto de hojas de índigo que contiene triptantrina, sin someter el filtrado a ningún cambio. Como alternativa, el filtrado obtenido se puede secar (por ejemplo, secado a presión reducida o liofilizado) hasta un sólido (por ejemplo, un polvo), y el sólido resultante se puede usar como un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina. El alcance de la presente invención también incluye tales extractos de hojas de planta de índigo que contienen triptantrina.

15 Extracto de hojas de índigo que contiene triptantrina

20 El extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina de la presente invención exhibe una estabilidad elevada a la luz en forma de disolución, y provoca poca irritación a la piel (en particular, sensibilización de la piel); por lo tanto, el extracto es adecuado para la aplicación a la piel. En particular, cuando el filtrado obtenido mediante la filtración anterior se usa en su estado actual como extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina, la concentración casi no tiene ningún cambio, incluso después de la exposición a luz blanca durante 2 semanas. Más específicamente, es preferible que se mantenga después de la irradiación por lo menos 80% (más preferentemente 90% o más) del contenido de triptantrina antes de la irradiación con luz blanca. La irradiación con luz blanca se refiere en la presente memoria a irradiación con luz blanca de alrededor de 10.000 lux. La irradiación se puede llevar a cabo usando lámparas fluorescentes blancas habituales.

25 Además, cuando una pasta, un sólido (por ejemplo, un polvo), etc., obtenido concentrando o secando el filtrado, se disuelve nuevamente en un disolvente adecuado, se puede proporcionar el mismo efecto como se describe anteriormente. Como disolvente adecuado, se puede usar, por ejemplo, por lo menos un disolvente seleccionado del grupo que consiste en agua, etanol, y alcoholes polihidroxilados mencionados anteriormente.

30 Cuando el extracto se usa en forma de una disolución, el filtrado se puede usar como tal. Como alternativa, un filtrado secado (por ejemplo, liofilizado) o procesado de otro modo en un sólido (por ejemplo, un polvo) se puede disolver en un disolvente adecuado, y se puede usar.

35 El extracto provoca irritación de la piel (en particular, sensibilización de la piel) tanto si el extracto es un extracto de etanol de hojas de planta de índigo o un extracto de alcohol polihídrico de hojas de planta de índigo. Sin embargo, el extracto de hojas de planta de índigo obtenido mediante el procedimiento de producción de la presente invención provoca mucha menos irritación (en particular, sensibilización de la piel). Aunque no se desea una interpretación restrictiva, este efecto se logra presumiblemente por la siguiente razón: aunque las hojas de planta de índigo contienen diversos irritantes de la piel, algunos de los cuales se disuelven en etanol, y otros de los cuales se disuelven en un alcohol polihídrico, las hojas de planta de índigo no contienen irritantes de la piel que se disuelven tanto en etanol como en alcoholes polihidroxilados. En base a esta suposición, para uso como extracto de etanol concentrado, se considera preferible eliminar el etanol del extracto de etanol tanto como sea posible. Además, se piensa que un extracto de hojas de planta de índigo que proporciona efectos similares también se puede producir mezclando un extracto de alcohol polihídrico concentrado de hojas de planta de índigo y etanol, filtrando la mezcla, y recogiendo el filtrado.

45 Composición para aplicación externa a la piel, que comprende un extracto de hojas de índigo que contiene triptantrina

50 La presente invención incluye además una composición cosmética adecuada para la aplicación externa a la piel, que comprende un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina. El extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina de la presente invención tiene una excelente estabilidad a la luz (estabilidad a la luz) y estabilidad a la temperatura, provoca poca irritación a la piel, y es adecuado para la aplicación a la piel. Por lo tanto, con el uso de la composición para la aplicación externa a la piel según la presente invención, se puede disfrutar preferentemente el efecto de la triptantrina. Específicamente, el contenido de triptantrina de la composición para aplicación externa a la piel según la presente invención no tiene casi ninguna reducción debido a la temperatura o a la luz, incluso después del almacenamiento a largo plazo, y la composición provoca poca irritación a la piel y puede exhibir preferentemente los efectos de triptantrina, tales como efectos antiinflamatorios y efectos antialérgicos.

60 La composición cosmética adecuada para aplicación externa a la piel según la presente invención puede ser un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina (incluyendo una forma de disolución del mismo) solo, o puede comprender, además del extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina, ingredientes opcionales que se sabe que se usan para aplicación externa a la piel, en tanto que no se perjudique el efecto de la presente invención. La cantidad de ingredientes opcionales se puede seleccionar adecuadamente,

en tanto que no se perjudique el efecto de la presente invención. Por ejemplo, los ingredientes opcionales se pueden usar en una cantidad de 0,1 a 99%, basada en el peso total de la composición para aplicación externa a la piel. Los ejemplos de ingredientes opcionales incluyen tensioactivos conocidos, polímeros solubles en agua, colorantes, antioxidantes, agentes secuestrantes, conservantes, ajustadores del pH, agentes de enfriamiento, agentes saborizantes, hidratantes, absorbentes de la radiación UV, dispersores de la radiación UV, agentes antioxidantes, aceites de ésteres, aceites animales y vegetales, y similares. Además, también se pueden incorporar otros ingredientes activos usados para aplicación externa a la piel, en tanto que se puedan proporcionar los efectos de la presente invención. Los ejemplos de tal ingrediente activo incluyen agentes blanqueantes conocidos, agentes antiinflamatorios, agentes antiarrugas, agentes lipolíticos, agentes de crecimiento del cabello, y similares.

La composición para la aplicación externa a la piel de la presente invención se puede usar, por ejemplo, como una preparación externa para la piel (fármaco o cuasi-fármaco), o como un cosmético. La preparación externa para la piel se puede usar en una forma de dosificación adecuada para la aplicación a la piel, tales como geles, cremas, ungüentos, linimentos, lociones, emulsiones, polvos, agentes de suspensión, aerosoles, apósitos, cataplasmas, cintas, apósitos, y similares. Resultan preferidos los geles, las cremas, y las emulsiones. El cosmético se puede usar como un cosmético para la piel, tales como lociones, emulsiones, cremas, sueros, paquetes, lociones de base de maquillaje, cremas de base de maquillaje, bases de maquillaje, colores de ojos, colores de mejillas, lápices labiales, y protectores solares; limpiadores de la piel, tales como lociones limpiadoras, cremas limpiadoras, espumas limpiadoras, jabones faciales, lavados faciales, y champús corporales; cosméticos para el cabello, tales como champús para el cabello, enjuagues para el cabello, y tratamientos para el cabello; sales de baño; o similares. Son preferibles las cremas, sueros, y protectores solares. Estos productos se pueden producir mediante procedimientos conocidos usando el extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina, opcionalmente con los ingredientes opcionales y los ingredientes activos anteriores.

Ejemplos

La presente invención se explica de forma más específica a continuación. Sin embargo, la presente invención no está limitada al siguiente ejemplo.

Preparación de un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina

Ejemplo de producción: Un resumen de los procedimientos de producción como se muestran en la figura 1.

Se añadieron 50 g de hojas secadas al sol de *Polygonum tinctorium* (hojas recogidas después de que toda la planta se secó al sol) a 800 ml (740 g) de etanol al 99,5%, y se extrajeron con etanol a reflujo durante 2 horas. Tras la extracción, el extracto se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se filtró a través de un filtro de acero inoxidable de malla 300, para eliminar las hojas. El filtrado obtenido (extracto etanólico de hojas de planta de índigo) también se denomina en lo sucesivo como "extracto de Et de planta de índigo".

Se destilaron a presión reducida usando un evaporador giratorio alrededor de 530 g del extracto de Et de planta de índigo, y se concentraron hasta que el peso total se redujo a 7,9 g o menos. El concentrado obtenido se denomina en la presente memoria algunas veces en lo sucesivo como "extracto de Et de planta de índigo concentrado".

Después, se añadieron 80 ml de 1,3-butilenglicol que contiene agua al 50% (p/p) a alrededor de 5 g del extracto de Et de planta de índigo concentrado, para disolver el extracto. La disolución obtenida del extracto de Et de planta de índigo concentrado se filtró, y el filtrado se recogió. La filtración se llevó a cabo mediante filtración por succión usando un papel de filtro que puede retener partículas con un tamaño de partículas de alrededor de 10 µm o más (Qualitative Filter Paper No.1 producido por Advantech Co., Ltd.). El procedimiento para obtener el filtrado se repitió 22 veces. El peso medio de cada filtrado obtenido fue alrededor de 74 g. El filtrado se denomina en la presente memoria como "extracto de Et-BG de planta de índigo". El extracto de Et-BG de planta de índigo es un ejemplo de una realización preferida del extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina de la presente invención.

Ejemplo de producción comparativo: Un resumen de los procedimientos de producción como se muestra en la figura 2.

Se sumergieron cincuenta gramos de hojas secadas al sol de *Polygonum tinctorium* (hojas recogidas después de que toda la planta se secó al sol) en 1,3-butilenglicol que contiene agua al 50% (p/p), y se dejaron reposar a 55°C durante 5 horas. El producto resultante se filtró mediante filtración por succión (usando Qualitative Filter Paper No.1 producido por Advantech Co., Ltd.). El filtrado se denomina en la presente memoria en lo sucesivo como "extracto de BG de planta de índigo".

Examen de la estabilidad de triptantrina contenida en extractos de planta de índigo

El extracto de Et-BG de planta de índigo y el extracto de BG de planta de índigo se almacenaron en las cuatro condiciones (1) a (4), y el contenido de triptantrina de cada extracto se midió 1 mes, 2 meses, y 3 meses después del comienzo del almacenamiento. Adicionalmente, el extracto de Et-BG de planta de índigo se midió 2 semanas después del comienzo del almacenamiento. Para la irradiación con lámparas fluorescentes blancas, cada extracto se irradió con luz blanca de alrededor de 10.000 lux. Más específicamente, se colocaron en paralelo (distancia entre las lámparas: alrededor de 30 cm) dos lámparas fluorescentes blancas (FL40SS-EX-D/37 (forma larga) producida por Panasonic Corporation, longitud: 1198 mm, diámetro del tubo de vidrio: 28 mm), y cada extracto se colocó en posición entre las lámparas (es decir, la distancia desde cada una de las lámparas fluorescentes blancas al extracto fue alrededor de 15 cm).

Condición (1): Almacenado a temperatura ambiente en un sitio oscuro.

Condición (2): Almacenado a 40°C en un sitio oscuro.

Condición (3): Almacenado a -5°C en un sitio oscuro.

Condición (4): Almacenado a temperatura ambiente bajo irradiación constante con las lámparas fluorescentes blancas.

El contenido de triptantrina se midió usando HPLC mediante comparación con una muestra de referencia en las siguientes condiciones:

Condiciones de HPLC

Columna: Cosmosil 5C18 MS-II 4,6 x 150 mm (5 µm)

Eluyente: agua/metanol = 50/50

Caudal: 1 ml/min.

Temperatura de la columna: 40°C

Longitud de onda de detección: 254 nm

Volumen de inyección: 20 µl

La figura 3 representa los resultados del extracto de Et-BG de planta de índigo. La figura 4 muestra los resultados del extracto de BG de planta de índigo. A partir de las Figs. 3 y 4, se confirmó que el extracto de Et-BG de planta de índigo exhibe una excelente estabilidad a la luz (estable durante por lo menos 1 mes, incluso bajo irradiación con luz), mientras que la triptantrina se descompone por la luz en el extracto de BG de planta de índigo y se reduce el contenido de triptantrina. Los resultados también mostraron que ambos extractos tienen una excelente estabilidad a la temperatura. Además, comparado con el extracto de BG de planta de índigo, el extracto de Et-BG de planta de índigo tiene una concentración extraordinariamente elevada de triptantrina. Esto indica que el extracto de Et-BG de planta de índigo es un extracto enriquecido en triptantrina. Se supone que la condición (4) anterior de irradiación durante un mes con luz correspondería a alrededor de 1 año de irradiación lumínica del extracto si el extracto estuviera presente en el expositor como producto en una tienda. De este modo, se piensa que el extracto exhibiría una estabilidad suficiente a la luz si se comercializa.

Examen de la irritación de la piel (sensibilización) del extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina

Ejemplo 1 de Ensayo: Sensibilización de la piel del extracto de BG de planta de índigo

La sensibilización de la piel del extracto de BG de planta de índigo se ensayó usando cobayas (5 cobayas en un grupo de sensibilización, y 3 cobayas en un grupo de control; adquiridos de Japan SLC, Inc.) mediante el procedimiento de ensayo de maximización en cobayas (método de GPMT). El extracto de BG de planta de índigo usado en este ensayo tuvo una concentración de triptantrina de 20,4 µg/ml. El adyuvante completo de Freund (FCA) usado en el ensayo se adquirió de Difco Laboratories, Inc.

La sensibilización intradérmica se llevó a cabo de la manera descrita con detalle como se expone a continuación. Específicamente, en el primer día de sensibilización, al grupo de sensibilización se le administró las siguientes sustancias (a), (b), y (c), en este orden, y al grupo de control se le administró las siguientes sustancias (a), (d), y (a), en este orden, a los lados derecho e izquierdo, es decir, dos localizaciones, de la piel del cuello de cada cobaya, en porciones de 0,1 ml, de tal manera que cada posición de administración estaba ligeramente escalonada. En otras palabras, a cada cobaya se le administró intradérmicamente en tres sitios en el lado derecho de la piel del cuello, y en tres sitios en el lado izquierdo de la misma. En el grupo de sensibilización, el

intervalo de administración entre (a) y (b) se ajustó para que fuese más corto que el intervalo de administración entre (b) y (c). En el grupo de control, el intervalo de administración entre (a) y (d) se ajustó para que fuese más corto que el intervalo de administración entre (d) y (a). Además, el intervalo de administración entre (a) y (b) en el grupo de sensibilización, y el intervalo de administración entre (a) y (d) en el grupo de control, se ajustaron para que fuesen casi iguales entre sí. El intervalo de administración entre (b) y (c) en el grupo de sensibilización, y el intervalo de administración entre (d) y (a) en el grupo de control, se ajustaron para que fuesen casi iguales entre sí.

(a): Emulsión que contiene cantidades iguales de adyuvante completo de Freund (FCA) y disolución salina fisiológica

(b): Disolución al 30% p/p de extracto de BG de planta de índigo (disolvente: disolución salina fisiológica),

(c): Emulsión que contiene cantidades iguales de disolución al 60% p/p de extracto de BG de planta de índigo (disolvente: disolución salina fisiológica) y FCA

(d): Disolución salina fisiológica

La sensibilización por contacto se llevó a cabo como sigue. En el día 7 desde la sensibilización intradérmica (Día 0), se impregnó una tela de linter de 2 x 4 cm con 0,2 ml de extracto de Et de planta de índigo, y se aplicó de forma oclusiva al sitio de la administración intradérmica durante 48 horas.

La exposición se realizó como se expone a continuación. En el día 21 desde la sensibilización, se impregnó la parte de tela de una tira de tejido para prueba epicutánea con 0,1 ml de una disolución al 50% p/p del extracto de BG de planta de índigo (disolvente: agua para inyección), y el parche resultante se aplicó de forma oclusiva al lado ventral de cada cobaya durante 24 horas. La observación de la reacción de la piel se llevó a cabo 24 horas y 48 horas después de retirar el parche de la exposición. En la figura 5 y a continuación, se muestra un resumen del examen.

Método de ensayo: procedimiento de ensayo de maximización en cobayas (método de GPMT)

Animal usado: Cobayas blancos (5 cobayas para el grupo de sensibilización, y 3 cobayas para los grupos de control)

Muestra: Extracto de BG de planta de índigo

Método: Día 0: Se administraron intracutáneamente FCA, la muestra (30%), y una combinación de FCA y la muestra (60%) al lado dorsal del cuello. (Sensibilización)

Día 7: La muestra (100%) se aplicó de forma oclusiva durante 48 horas. (Sensibilización)

Día 21: La muestra (50%) se aplicó de forma oclusiva al lado ventral. (Exposición)

Días 22 a 23: La observación se realizó 24 horas y 48 horas después de la sensibilización.

No hubo ninguna anomalía observada en la condición general de los sujetos durante el período de ensayo, y el peso corporal de cada sujeto también aumentó de forma ininterrumpida. Los resultados de las observaciones de la piel (48 horas después de la retirada del parche) se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Muestra de administración	Grupo de sensibilización		Grupo de control	
	Tasa positiva (%)	Puntuación media de la evaluación	Tasa positiva (%)	Puntuación media de la evaluación
Extracto de BG de planta de índigo al 50%	100	4,2	0	0

Los procedimientos para calcular la tasa positiva y la puntuación media de la evaluación en la tabla 1, etc., se muestran en la figura 6 y en la presente memoria a continuación.

Evaluación: Criterios de reacción de la piel (método de Draize)

Eritema y formación de costra 0 a 4 + formación de edema 0 a 4 = total de 0 a 8 (puntuación)

Eritema y formación de costra

0: Sin eritema

1: Eritema muy leve (apenas perceptible)

5 2: Eritema bien definido

3: Eritema moderado a grave

10 4: Eritema grave (rojo carmesí) a formaciones leves de costra (lesiones profundas)

Formación de edema

0: Sin edema

15 1: Edema muy ligero (apenas perceptible)

2: Edema ligero (bordes del área bien definidos por elevación evidente)

20 3: Edema moderado (elevado aproximadamente 1 milímetro)

4: Edema grave (elevado más de 1 milímetro y que se extiende más allá del área de exposición)

25 En cada juicio, una puntuación total igual o mayor que 1 para “Eritema y Formación de Costra” y “Edema” se juzgó como positiva, y se obtuvo una tasa positiva a partir de la siguiente fórmula. Como tasa de sensibilización, se usó una diferencia entre la tasa positiva del grupo de sensibilización y la tasa positiva del grupo de control, y se llevó a cabo la clasificación de la evaluación de la sensibilización según los criterios anteriores. Sin embargo, la sensibilización de 0% se definió como sin sensibilización. La puntuación media de la evaluación también se calculó a partir de la siguiente fórmula. La tasa de sensibilización se calculó a partir de la siguiente fórmula.

30 Tasa positiva (%) = (Número de animales positivos/Número total de animales) x 100

Puntuación media de la evaluación = (Puntuación total de eritema y edema)/Número de animales

35 Tasa de sensibilización (%) = Tasa positiva de grupo de sensibilización – Tasa positiva de grupo de control

A partir de la tasa de sensibilización obtenida, la clasificación de la evaluación de sensibilización se puede determinar como se expone a continuación.

Tasa de Sensibilización (%)	Grado	Clasificación
0 a 8	I	Débil
9 a 28	II	Leve
29 a 64	III	Moderada
65 a 80	IV	Fuerte
81 a 100	V	Extrema

40 Como se muestra anteriormente, el extracto de BG de planta de índigo exhibió efectos de sensibilización de la piel. La clasificación de la evaluación de la sensibilización del extracto de BG de planta de índigo a la concentración de exposición de 50% p/p fue Grado V (extrema).

45 Ejemplo 2 de Ensayo: Sensibilización de la piel de extracto de Et de planta de índigo y extracto de Et-BG de planta de índigo

50 La sensibilización de la piel del extracto de Et de planta de índigo y del extracto de Et-BG de planta de índigo se examinó mediante el procedimiento de adyuvante y de prueba epicutánea usando cobayas (5 cobayas en un grupo de sensibilización, y 3 cobayas en un grupo de control; adquiridos de Japan SLC, Inc.). La concentración de triptantrina en el extracto de Et de planta de índigo usada en este ensayo fue 17,0 µg/ml, y la concentración de triptantrina en el extracto de Et-BG de planta de índigo usada en el ensayo fue 17,2 µg/ml. Adicionalmente, el adyuvante completo de Freund (FCA) usado en el ensayo se adquirió de Difco Laboratories.

55 La sensibilización para el grupo de sensibilización se llevó a cabo como se expone a continuación. En el día 0 de la sensibilización, se administró intradérmicamente una emulsión que contiene cantidades iguales de adyuvante completo de Freund (FCA) y disolución salina fisiológica en las cuatro esquinas de un sitio de administración (piel del cuello), y los puntos administrados se marcaron raspando el símbolo de almohadilla (#) sobre ellos con una aguja hipodérmica. Después, usando una tela de linter de 2 x 4 cm impregnada con 0,1 ml del extracto de Et de planta de índigo, se aplicó un parche oclusivo durante 24 horas, de manera que todos los arañazos de los cuatro

signos de almohadilla se cubrieron. En el día 1 y en el día 2, se realizaron los mismos procedimientos, excepto para la administración intradérmica. En el día 7, se aplicó al mismo sitio durante 48 horas un parche oclusivo de una tela de linter de 2 x 4 cm impregnada con 0,2 ml del extracto de Et de planta de índigo. Para el grupo de control, se llevó a cabo un tratamiento similar usando agua para inyección en lugar de los extractos.

La exposición se llevó a cabo como se expone a continuación. En el día 21 desde la sensibilización, la parte de tela de cada tira de tejido para la prueba epicutánea se impregnó con 0,1 ml de una disolución al 50% p/p del extracto de Et de planta de índigo o una disolución al 50% p/p del extracto de Et-BG de planta de índigo (usando en ambos casos agua para inyección como disolvente), y los parches oclusivos se aplicaron a las partes ventrales derecha e izquierda de cobayas durante 24 horas. La observación de la reacción de la piel se realizó 24 horas y 48 horas después de retirar el parche de la exposición. En la figura 7 y a continuación se muestra un resumen del examen.

Método de ensayo: Ensayo de adyuvante y prueba epicutánea

Animal usado: Cobayas blancos (5 cobayas para el grupo de tratamiento, y 3 cobayas para el grupo de control)

Método: Día 0: Administración intradérmica de FCA al lado dorsal del cuello. (En la figura 7, las posiciones administradas se muestran mediante símbolos de almohadilla en las cuatro esquinas en el número 1 (cuello) en el dibujo de un cobaya).

Método: Día 0: Se administró intradérmicamente FCA al sitio dorsal del cuello. (En la figura 7, las posiciones administradas se muestran mediante símbolos de almohadilla en las cuatro esquinas en el número 1 (cuello) en el dibujo de un cobaya).

Días 0 a 2: Se aplicó de forma oclusiva un parche de la muestra (100%) durante 24 horas x 3 días (extracto de Et de planta de índigo).

Días 7 a 9: Se aplicó de forma oclusiva un parche de la muestra (100%) durante 48 horas en una parte ventral (extracto de Et de planta de índigo)

Días 21 a 22: Se aplicó de forma oclusiva un parche de la muestra (50%) en una parte ventral (extracto de Et de planta de índigo, extracto de Et-BG de planta de índigo)

Días 23 a 24: El parche se retiró, y después se realizó la observación 24 y 48 horas más tarde.

El dibujo de un cobaya en la figura 7 representa un resumen de los arañazos (4 localizaciones) que presentan una forma de un símbolo de almohadilla, un sitio de parche oclusivo usado para la sensibilización, y un sitio de parche oclusivo usado para la exposición.

No hubo anomalías observadas en el estado general de los sujetos durante el período de ensayo, y el peso corporal de cada sujeto también se incrementó constantemente. En la tabla 2 se muestran los resultados de las observaciones de la piel (48 horas tras la retirada del parche) cuando la exposición se llevó a cabo usando una disolución al 50% p/p. Los procedimientos de cálculo, etc., para "tasa positiva" y "puntuación media de la evaluación" en la tabla 2 son similares a aquellos en el ejemplo 1 de Ensayo (representado anteriormente o en la figura 6).

Tabla 2

Muestra de administración	Grupo de sensibilización		Grupo de control	
	Tasa positiva (%)	Puntuación media de la evaluación	Tasa positiva (%)	Puntuación media de la evaluación
Extracto de Et de planta de índigo al 50%	40	0,4	0	0
Extracto de Et-BG de planta de índigo al 50%	0	0	0	0

Como se muestra anteriormente, aunque se observó sensibilización de la piel con el extracto de Et de planta de índigo, no se observó sensibilización de la piel con el extracto de Et-BG de planta de índigo. La clasificación de la evaluación de la sensibilización del extracto de Et de planta de índigo a la concentración de exposición de 50% p/p fue de Grado III (moderada).

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el extracto de BG de planta de índigo y el extracto de Et de planta de índigo tienen el potencial para provocar sensibilización de la piel, y que el extracto de Et-BG de planta de índigo no tiene ningún potencial para provocar la sensibilización de la piel, y por lo tanto resulta preferido para

la aplicación a la piel.

Examen de diversas hojas de planta de índigo secada

5 Se examinó si la cantidad de triptantrina contenida en un extracto de hojas de planta de índigo obtenido cambia dependiendo del estado de la hoja de planta de índigo usada.

10 Se cosechó una planta completa de *Polygonum tinctorium* (parte por encima de la tierra), se transportó refrigerada mientras se insertaba en una esponja que suministra agua, y se secó como se describe a continuación.

1) Hojas recientes (no secadas).

15 2) Las hojas se recolectaron de toda la planta y después se liofilizaron (12 horas).

3) Las hojas se recolectaron de toda la planta y después se secaron por calor (80°C, 24 horas).

4) Las hojas se recolectaron de toda la planta y después se secaron al sol (2 días; antes de la floración).

20 5) Las hojas se recolectaron de toda la planta y después se secaron al sol (2 días; después de la floración).

6) Toda la planta se secó al sol (7 días), y después se recolectaron las hojas.

25 En todos los procedimientos, se usaron 40 g de hojas recientes de una planta de índigo chino. Después del secado, en todos los casos se obtuvieron alrededor de 7,5 g de hojas secadas.

30 A continuación, usando hojas recientes u hojas secadas descritas anteriormente en los apartados 1) a 6), y hojas de planta de índigo secadas comercialmente disponibles, se produjeron extractos de Et de planta de índigo de manera similar al procedimiento descrito en el ejemplo 1 de Producción anterior. Después, la cantidad de triptantrina contenida en cada extracto se midió usando las condiciones de HPLC descritas anteriormente.

35 Los resultados se representan en la figura 8. A partir de los resultados, se reveló que se puede obtener un extracto que contiene una mayor cantidad de triptantrina usando hojas secadas en lugar de hojas recientes, se puede obtener un extracto que contiene una cantidad significativamente mayor de triptantrina usando hojas secadas al sol, y que la cantidad de triptantrina contenida en hojas de planta de índigo se puede mejorar secando las hojas de planta de índigo a la luz del sol.

Examen de la actividad antibacteriana del extracto de hojas de planta de índigo

40 Se examinaron las potencias de las actividades antibacterianas de diversos extractos de hojas de planta de índigo como se describe a continuación. El medio líquido SCD y el medio de agar SCDLP usados en el examen se adquirieron de Merck Ltd. Específicamente, como el medio líquido SCD, se usó "Soybean Casein Digest" (producido por la compañía Merck Ltd.), y como el medio de agar SCDLP, se usó "Soybean Casein Digest Agar with Lecithin and Polysorbate 80" (producido por la compañía Merck Ltd.). Además, el "extracto acuoso de planta de índigo" usado en el examen es un extracto de hojas de planta de índigo obtenido usando agua en lugar de 1,3-butilenglicol mezclado con agua al 50% (p/p) usando en el procedimiento para producir el extracto de BG de planta de índigo (es decir, el procedimiento expuesto en el ejemplo de producción comparativo anterior).

50 Se suspendió *Staphylococcus aureus* (NBRC 13276) en 5 ml de medio líquido SCD, y se cultivó toda la noche a 30°C mediante agitación. Este cultivo se diluyó usando medio líquido SCD, de manera que tuvo 0,5 McFarland (equivalente a una concentración de recuento de células viables de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU/ml). La dilución obtenida se diluyó adicionalmente 100 veces usando medio líquido SCD, para obtener un líquido de la suspensión bacteriana.

55 Se añadieron 150 µl del extracto de Et-BG de planta de índigo, del extracto de BG de planta de índigo, del extracto acuoso de planta de índigo, o de agua a 4,5 ml de medio líquido SCD dispensado en un tubo de ensayo, y se le añadió adicionalmente medio líquido SCD para obtener un volumen total de 5 ml. Se añadieron 50 µl de líquido de suspensión bacteriana al medio obtenido que contiene extracto, y la mezcla se agitó a conciencia, y se cultivó durante 24 horas a 30°C mediante agitación. El medio de cultivo líquido obtenido de esta manera se usó como un líquido de bacterias cultivadas. El líquido de bacterias cultivadas se diluyó en serie 10 veces por dilución usando una disolución de cloruro sódico al 0,85%, y se sembraron 100 µl de cada dilución diluida en serie sobre medio de agar SCDLP, y se cultivaron durante 1 día a 30°C. Específicamente, el líquido de bacterias cultivadas que contiene el extracto de Et-BG de planta de índigo se diluyó 10^4 veces o 10^5 veces, y cada una de las disoluciones así obtenidas se sembró en placa y se cultivó en dos placas con medio de agar (total de 4 placas). 65 El cultivo de los líquidos de bacterias cultivadas que contienen otros extractos o agua se condujo de forma similar, excepto que los líquidos se diluyeron 10^5 veces o 10^6 veces. Se contó el número de colonias generadas

sobre la superficie del medio, y se obtuvo un recuento de células viables (CFU/ml) contenido en 1 ml de un líquido de bacterias cultivadas, basándose en el recuento de colonias medidas. La figura 9 es una gráfica que muestra las relaciones relativas de los recuentos de células viables obtenidos usando cada uno de los extractos de hojas de planta de índigo, con el recuento de célula viable obtenido usando agua en lugar de los extractos de hojas de planta de índigo, que se define como 1. En la figura 9, un único asterisco (*) indica $p < 0,05$, y dos asteriscos (**) indica $p < 0,005$. No se observaron diferencias significativas entre cuando el cultivo se realiza añadiendo el extracto de BG de planta de índigo o el extracto acuoso de planta de índigo al medio, y cuando el cultivo se realiza añadiendo agua al medio.

5

10 A partir de los resultados anteriores, se reveló que el extracto de Et-BG de planta de índigo tiene una actividad antibacteriana extremadamente superior.

15 A continuación se muestran ejemplos de Formulación de la composición para aplicación externa a la piel de la presente invención. Cada uno de los ejemplos de Formulación se preparó según un procedimiento usado normalmente en la técnica. En los ejemplos de formulación, "extracto de planta de índigo" se refiere al extracto de Et-BG de planta de índigo; y % representa % en masa.

Tabla 3

Ejemplo 1 de Formulación: Loción de belleza	
Ingrediente	Cantidad de mezcla (%)
Extracto de planta de índigo	10
Glicerina concentrada	1
Escualano	2
Aceite de oliva	2
Aceite de jojoba	1,8
Tetraoctanoato de pentaeritritilo	1
Polioxietilen oleil éter	0,8
Metilpolisiloxano	0,5
Parahidroxibenzoato de metilo	0,1
Polímero carboxivinílico	0,2
Goma de xantana	0,05
Hidróxido de potasio	Cantidad adecuada (ajustado a pH de 7,5)
Agua purificada	Porción restante
Total	100

20

Tabla 4

Ejemplo 2 de Formulación: Loción facial	
Ingrediente	Cantidad de mezcla (%)
Extracto de planta de índigo	1
Etanol	5
Glicerina concentrada	10
1,3-Butilenglicol	5
Hialuronato sódico	0,2
Aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado (60 EO)	0,6
Parahidroxibenzoato de metilo	0,1
Ácido cítrico	0,06
Citrato de sodio	0,08
Agua purificada	Porción restante
Total	100

25

Tabla 5

Ejemplo 3 de Formulación: Crema para la piel	
Ingrediente	Cantidad de mezcla (%)
Extracto de planta de índigo	5
Glicerina concentrada	10
Escualano	8
Aceite de oliva	4
Aceite de nueces de macadamia	4
Ácido esteárico	3
Cetanol	3
Monoestearato de glicerilo lipófilo	3

Ejemplo 3 de Formulación: Crema para la piel	
Ingrediente	Cantidad de mezcla (%)
Monoestearato de poliglicerilo	2
Parahidroxibenzoato de metilo	0,2
Hidróxido de potasio	Cantidad adecuada (ajustado a pH de 6,5)
Agua purificada	Porción restante
Total	100

Tabla 6

Ejemplo 4 de Formulación: Crema contra la radiación UV	
Ingrediente	Cantidad de mezcla (%)
Silicona cíclica (n = 5)	15
Partícula fina de óxido de cinc	10
Partícula fina de óxido de titanio	5
Escualano	3
Aceite de avellana	2
Aceite de oliva	1
Alcohol behenílico	2
Diisosteato de poliglicerilo	2
Extracto de planta de índigo	1
Cloruro sódico	0,5
1,3-butilenglicol	5
Parahidroxibenzoato de metilo	0,1
Agua purificada	Porción restante
Total	100

Tabla 7

Ejemplo 5 de Formulación: Lavado de cara	
Ingrediente	Cantidad de mezcla (%)
Extracto de planta de índigo	0,5
Laurato de potasio	5
Miristato de potasio	15
Palmitato de potasio	10
Estearato de potasio	10
Polietilenglicol	5
Dietanolamida de ácido graso de aceite de palma	2
Glicerilo de ácido graso de aceite de palma polioxietilenado	1
Glicerina concentrada	10
Parahidroxibenzoato de metilo	0,1
Agua purificada	Porción restante
Total	100

Tabla 8

Ejemplo 6 de Formulación: Agente de limpieza	
Ingrediente	Cantidad de mezcla (%)
Extracto de planta de índigo	1
Sal Mg de ácido laurilsulfosuccínico POE (3EO)	2
Sorbitol de ácido tetraoleico POE (40)	1
Monoestearato de glicerilo autoemulsionable	2
Ácido esteárico	4
Cetanol	2
Palmitato de cetilo	2
Parafina (135°F)	2
Parafina líquida	30
Palmitato de isopropilo	10
Etilhexanoato de tri-2-glicerilo	10
Parahidroxibenzoato de metilo	0,1
1,3-Butilenglicol	5
Perfume	0,1
Ácido cítrico	Cantidad adecuada (ajustado a pH de 5,0)

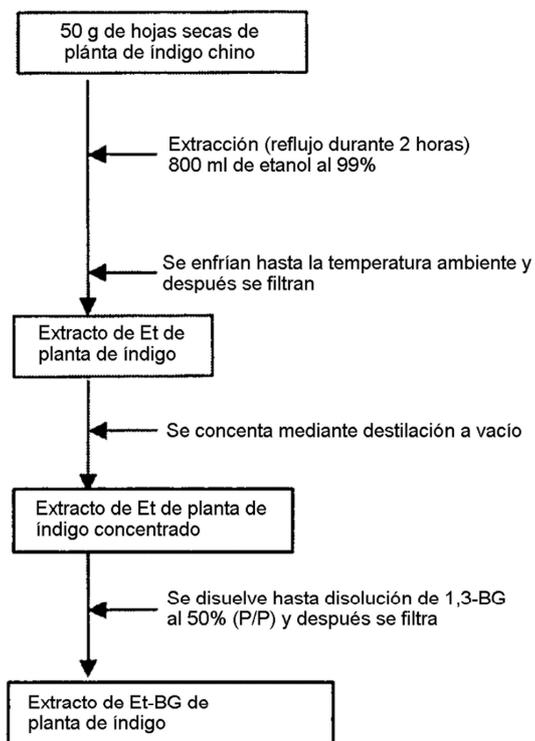
ES 2 653 917 T3

Ejemplo 6 de Formulación: Agente de limpieza	
Ingrediente	Cantidad de mezcla (%)
Agua purificada	Porción restante
Total	100

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina, que comprende las etapas siguientes:
- 5 (i) extraer hojas de planta de índigo con etanol,
- (ii) concentrar el extracto de etanol de hojas de planta de índigo,
- 10 (iii) mezclar el extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo con un alcohol polihídrico o con un alcohol polihídrico hidratado, y
- (iv) filtrar la mezcla del extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y el alcohol polihídrico, y recoger el filtrado.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla comprende además agua.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el alcohol polihídrico es por lo menos un glicol seleccionado de entre el grupo que consiste en 1,3-butilenglicol, propilenglicol, isoprenglicol, y pentilenglicol.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende mezclar el extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo con un alcohol polihídrico hidratado, filtrar la mezcla resultante que comprende el extracto de etanol concentrado de hojas de planta de índigo y el alcohol polihídrico hidratado, y recoger el filtrado.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las hojas de planta de índigo son hojas secadas.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que las hojas de planta de índigo son hojas secadas al sol.
7. Extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina, que se obtiene mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 35 8. Composición cosmética adecuada para la aplicación externa a la piel, que comprende el extracto de hojas de planta de índigo que contiene triptantrina según la reivindicación 7.

Fig. 1



Nota: La concentración se define por el volumen de la disolución de disolvente añadida al producto de la concentración.

Fig. 2

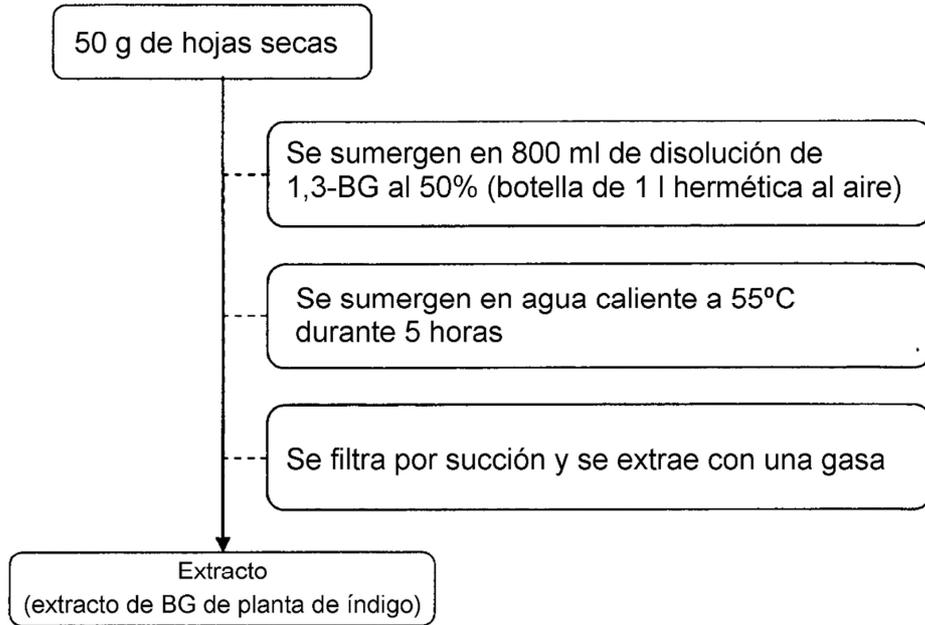


Fig. 3

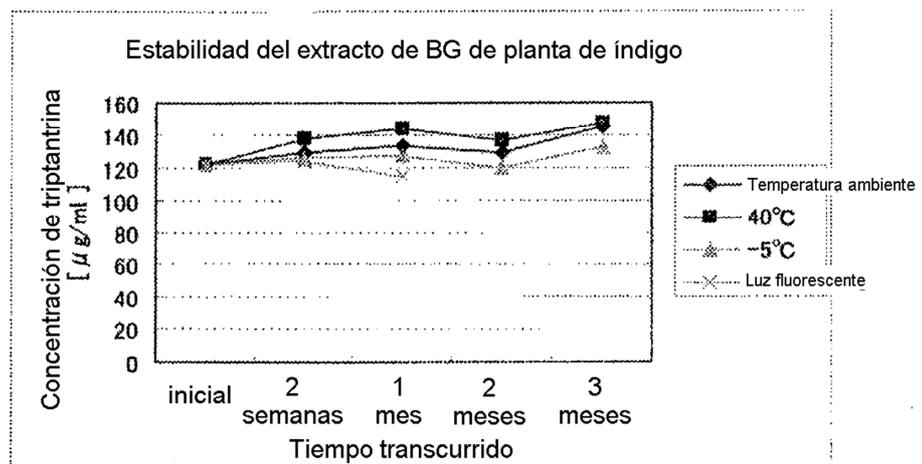


Fig. 4

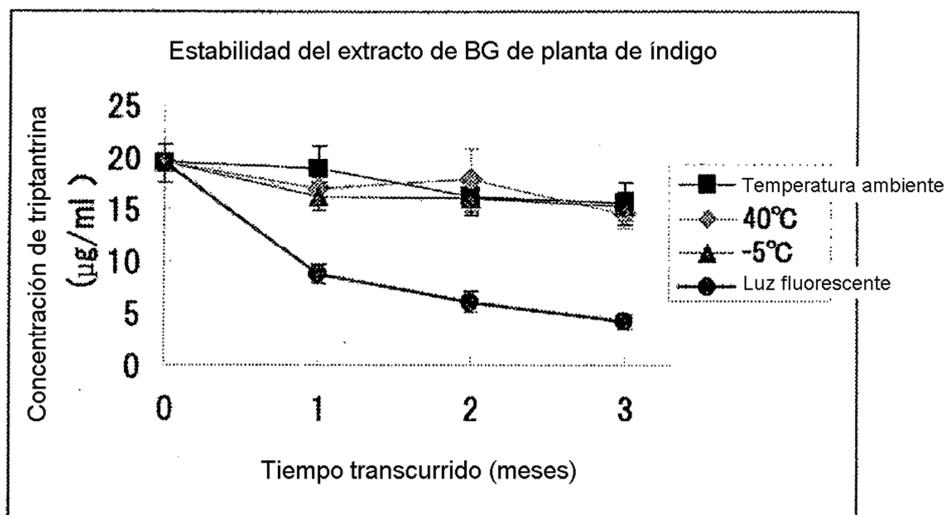


Fig. 5

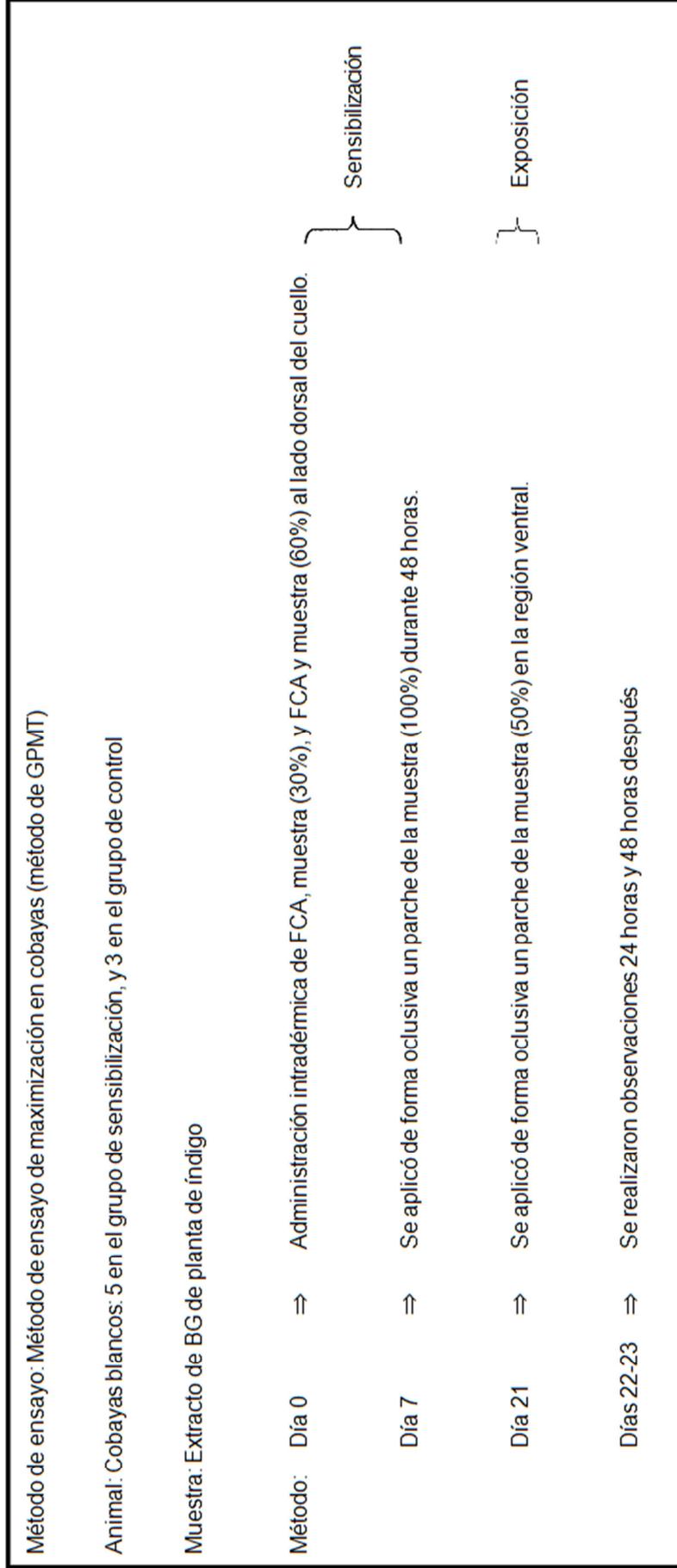


Fig. 6

Juicio: Estándar de evaluación de la reacción de la piel (método de Draize) => Eritema y formación de costra 0-4 + Edema 0-4 = Total 0-8 (grados)

< Eritema y formación de costra >

0: Sin eritema

1: Eritema muy leve (apenas perceptible)

2: Eritema bien definido

3: Eritema moderado a grave

4: Eritema grave (rojo carmesí) a formaciones leves de costra (lesiones profundas)

< Formación de edema >

0: Sin edema

1: Edema muy ligero (apenas perceptible)

2: Edema ligero (bordes del área bien definidos por elevación evidente)

3: Edema moderado (elevado aproximadamente 1 milímetro)

4: Edema grave (elevado más de 1 milímetro y que se extiende más allá del área de exposición)

En cada juicio, una puntuación total igual o mayor que 1 para "eritema y formación de costra" y "edema" se juzgó como positiva, y se obtuvo una tasa positiva a partir de la siguiente fórmula.

Como tasa de sensibilización, se usó una diferencia entre la tasa positiva del grupo de sensibilización y la tasa positiva del grupo de control, y se llevó a cabo la clasificación de la evaluación de la sensibilización según los criterios anteriores.

Sin embargo, la sensibilización de 0% se definió como sin sensibilización. Además, el grado medio también se calculó a partir de la siguiente fórmula.

También, la tasa de sensibilización se calculó a partir de la siguiente fórmula.

A partir de la tasa de sensibilización, se puede obtener la clasificación de la evaluación de sensibilización (tabla más abajo).

Tasa positiva (%) = (Número de animales positivos/Número total de animales) x 100

Puntuación media de la evaluación = (Puntuación total de eritema y edema)/Número de animales

Tasa de sensibilización (%) = Tasa positiva de grupo de sensibilización – Tasa positiva de grupo de control

Tasa de Sensibilización (%)	Grado	Clasificación
0-8	I	Débil
9-28	II	Leve
29-64	III	Moderada
65-80	IV	Fuerte
81-100	V	Extrema

Fig. 7

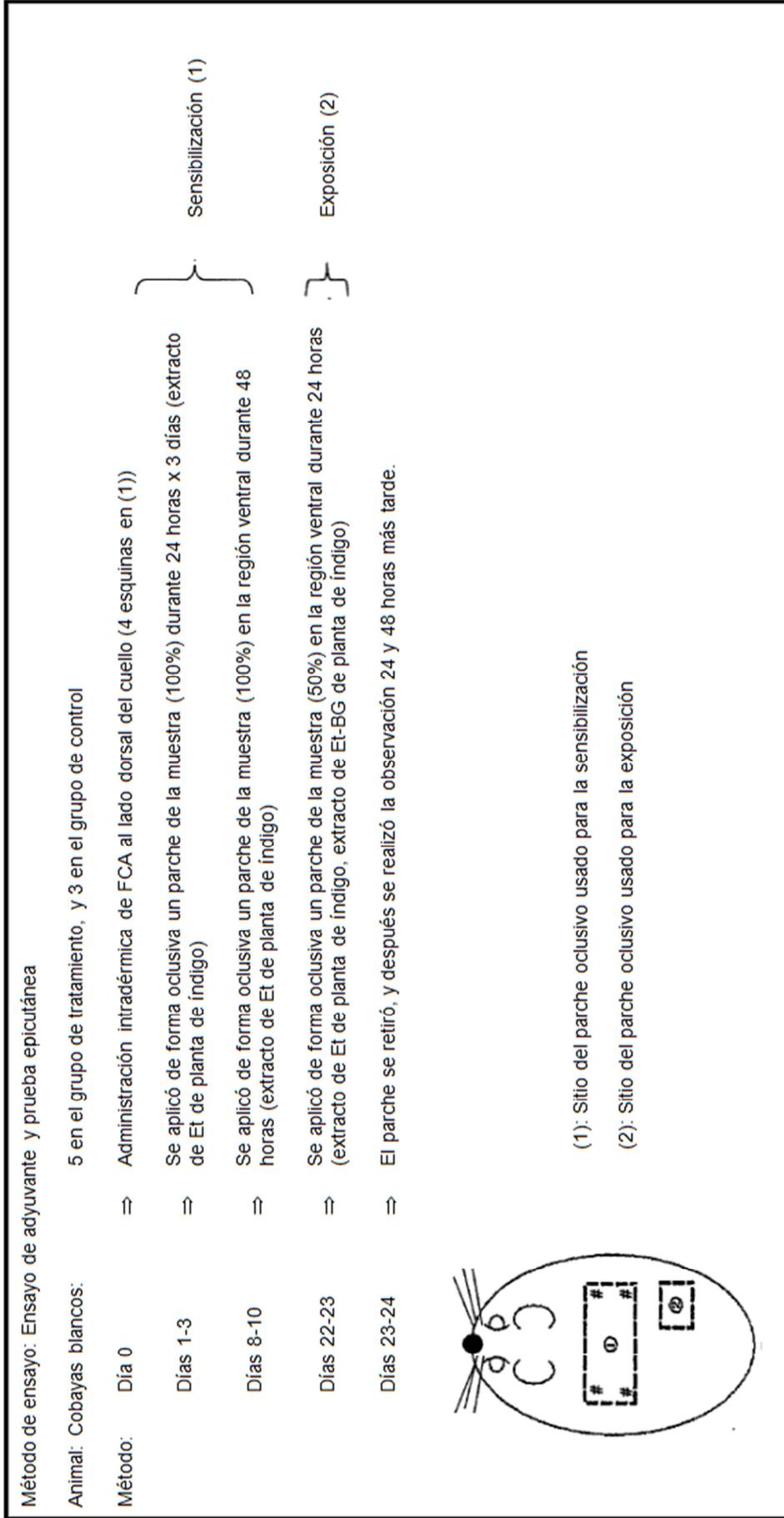


Fig. 8

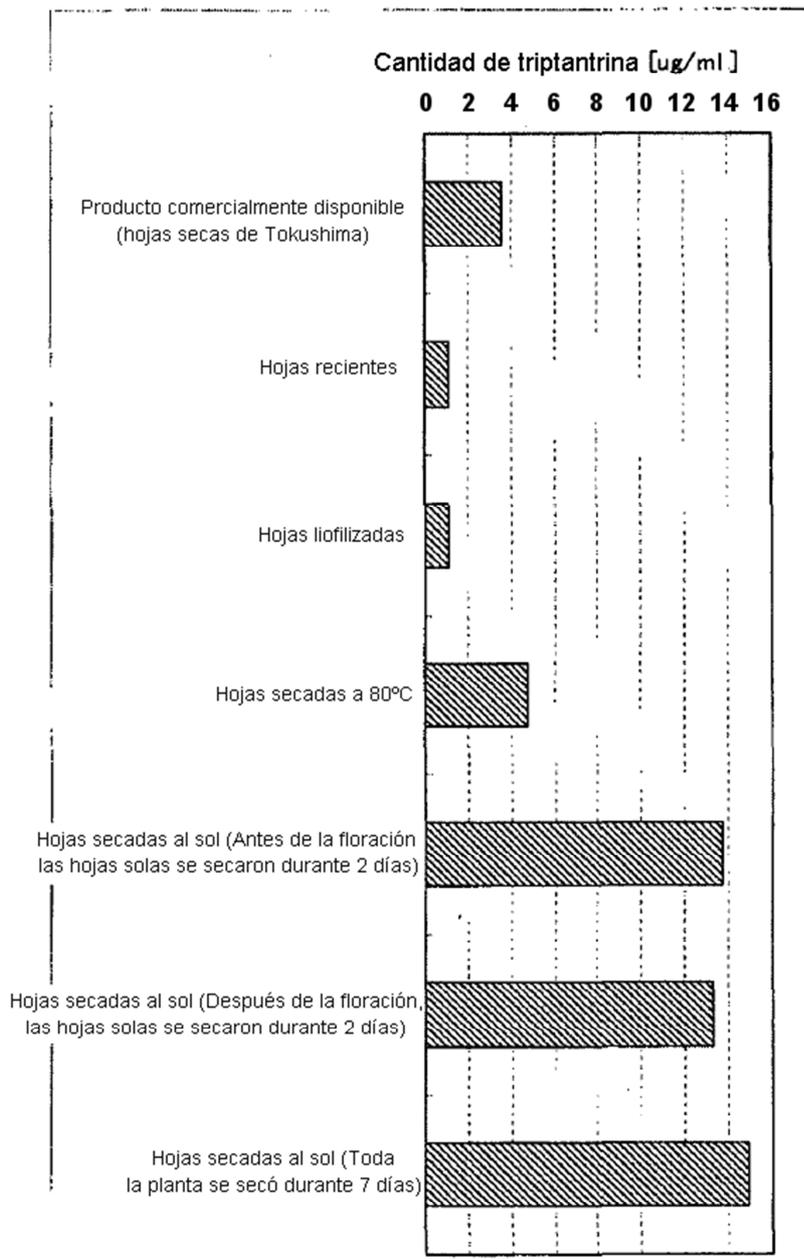


Fig. 9

