

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 502**

51 Int. Cl.:

A61K 36/36 (2006.01)

A61K 36/88 (2006.01)

A61K 8/14 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2015 PCT/EP2015/058241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2015 E 15715311 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 3134101**

54 Título: **Utilización de células vegetales de buganvilia para la encapsulación de ingredientes activos**

30 Prioridad:

23.04.2014 FR 1453647

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

18.10.2018

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DE RECHERCHE COSMÉTIQUE

S.À.R.L. (100.0%)

4 Place de Paris

2314 Luxembourg, LU

72 Inventor/es:

LECLERE, JACQUES y

ENNAMANY, RACHID

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 686 502 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

Utilización de células vegetales de buganvilia para la encapsulación de ingredientes activos

5 La presente invención se refiere al campo técnico general de los productos cosméticos para uso tópico, utilizables en particular sobre la piel.

Más precisamente, la presente invención se refiere a la utilización de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia para la encapsulación de ingredientes activos, y en particular de ingredientes activos desde un punto de vista cosmético. Se refiere también a las células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo, a su procedimiento de preparación, a las composiciones cosméticas a aplicación tópica que comprende tales células, a un procedimiento cosmético no terapéutico de tratamiento de la piel que utiliza tal composición cosmética, así como a la utilización no terapéutica de una composición cosmética para aplicación tópica que comprende tales células para el cuidado de la piel, y en particular para mejorar la firmeza de la piel, en particular favoreciendo la regeneración de la dermis y de la epidermis de la piel.

La piel es un verdadero órgano que comprende varias capas integradas, que va de la capa superficial, la epidermis, hasta las capas más profundas, la dermis y la hipodermis, y cada una de estas capas posee unas propiedades específicas que permite al conjunto reaccionar y adaptarse a las condiciones de su entorno.

La epidermis, principalmente compuesta de queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans, tienen un papel fundamental para asegurar la protección y el mantenimiento de una buena turgencia. Los queratinocitos son unas células extremadamente dinámicas que sufren una proliferación y una diferenciación permanentes al final de las cuales se transforman en células muertas (corneocitos), que se eliminan regularmente por descamación.

La dermis se compone principalmente de colágeno, elastina y proteoglicanos, moléculas sintetizadas por los fibroblastos dérmicos. Las fibras de colágeno aseguran la resistencia mecánica y la textura de la piel, la elastina es responsable de la elasticidad, y los proteoglicanos, que combinan proteínas y glicosaminoglicanos, desempeñan una función principal de estructura y de hidratación de la piel. Los glicosaminoglicanos, tales como el ácido hialurónico, son unas moléculas muy higroscópicas que son capaces de retener unas cantidades importantes de agua. Otras células como los macrófagos y los leucocitos están también presentes en la capa de la dermis.

La hipodermis, que es la capa más profunda de la piel, contiene los adipocitos que producen unos lípidos para que el tejido sub-cutáneo fabrique una capa grasa que protege los músculos, los huesos y los órganos internos contra los choques.

La piel está en constante renovación. La descamación de las células en la superficie se compensa por el nacimiento de nuevas unidades en la profundidad. Cuando los queratinocitos han perdido su núcleo y sus organitos celulares, toman el nombre de corneocitos. Con las fricciones, se arrancan o se desprenden bajo la acción programada de enzimas específicas: es el fenómeno de descamación.

Las agresiones del entorno, incluyendo las agresiones climáticas tal como la exposición al Sol, las variaciones de temperaturas, la contaminación, el estrés, la fatiga, y el envejecimiento en general tienden a alterar las capacidades naturales de regeneración de los queratinocitos que componen la epidermis que se vuelve entonces menos densa, conllevando la aparición de signos de envejecimiento cutáneos tales como arrugas o pequeñas arrugas y una firmeza disminuida.

Para atenuar o eliminar los signos del envejecimiento de la piel, se han propuesto diversos tratamientos a base de composiciones tales como cremas y lociones que contienen alfa-hidroxiácidos o retinoides, aplicadas regularmente para reducir progresivamente el número de arrugas o pequeñas arrugas. Se ha propuesto también implantes de colágeno para disimular las líneas de expresión alrededor de los ojos o de la boca, la dermoabrasión y los peelings químicos para eliminar la capa superior de la piel dañada, la cirugía estética, tal como la blefaroplastia (cirugía de los párpados) o un estiramiento facial para rejuvenecer una piel que presenta flacidez, o también una reestructuración con la ayuda de un láser con dióxido de carbono para eliminar las pequeñas arrugas. La patente FR-A-2.783.169 describe la utilización de pentapéptidos de tipo Lys-Thr-Thr-Lys-Ser en composiciones tópicas para favorecer la síntesis del colágeno y de los glicosaminoglicanos, y en consecuencia la regeneración cutánea.

Sin embargo, si todos estos productos y métodos conocidos pueden tener un efecto favorable sobre los signos del envejecimiento cutáneo, por ejemplo ocultando o reduciendo las arrugas, son generalmente sin incidencia sobre la evolución celular que conduce a estos signos del envejecimiento.

Por otro lado, las técnicas de encapsulación, aparecidas hace más de veinte años, no paran de progresar para optimizar la disponibilidad y la eficacia de los productos activos. La encapsulación agrupa el conjunto de las tecnologías que permiten la preparación de partículas individualizadas, constituidas de un material de recubrimiento que contiene un ingrediente activo. En cosmética, la encapsulación permite proteger el ingrediente activo de los otros ingredientes de la fórmula, lo libera lentamente y lo ayuda a penetrar a través de las capas cutáneas.

Los sistemas de encapsulación presentan una gran variedad de estructuras y pueden por lo tanto clasificarse en dos grandes categorías que son, por un lado, los sistemas matriciales también denominados microesferas y, por otro lado, los sistemas vesiculares también denominados microcápsulas.

5 Las microesferas son sistemas esféricos constituidos de una matriz (polímero, cera) en la que se dispersa o absorbe un principio activo.

10 Las microcápsulas son unos sistemas de depósitos compuestos de una envoltura que rodea un núcleo líquido, sólido o gaseoso. Con respecto a las microesferas, estas partículas tienen una gran capacidad de encapsulación y son por el contrario más frágiles y menos estables. En función de las aplicaciones consideradas, la envoltura de las microcápsulas se puede seleccionar entre los materiales poliméricos (por ejemplo derivados de los ácidos lácticos y glicólicos (PLGA, PLA), etilcelulosa, poli-épsilon-caprolactona), los materiales inorgánicos (por ejemplo sílice) o también los materiales lipídicos en el caso de liposomas formadas de una bicapa lipídica principalmente constituida de fosfolípidos.

15 Los liposomas pueden retener varios tipos de compuestos, ya sean hidrosolubles (encapsulados en la fase acuosa) o liposolubles o anfifílicos (envasados en la bicapa lipídica). Los liposomas tienen una estructura muy similar a la de las membranas celulares, lo que les permite fusionarse con ellas liberando el o los principios activos que contienen. Los liposomas se utilizan en el caso de aplicaciones dermatológicas y cosméticas, ya que permiten el suministro cutáneo, incluso transcutáneo, de moléculas hidrófobas y/o hidrófilas, sin limitación de su masa molecular. Sin embargo, la utilización de los liposomas no da siempre total satisfacción debido a la sensibilidad a la oxidación y la inestabilidad química de los fosfolípidos. Por otro lado, no presentan en general actividad intrínseca ya que sirven esencialmente para transportar un principio activo sin tener tampoco ellos mismos propiedades que pueden aprovecharse para el cuidado de la piel, en particular para mejorar la firmeza de la piel.

20 Los productos de origen natural o que contienen unos compuestos naturales son, por otro lado, cada vez más apreciados por los consumidores de productos cosméticos. Por ello, se encuentra en el mercado de productos cosméticos cada vez más productos que contienen sustancias naturales o de origen natural.

30 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un nuevo ingrediente utilizable en cosmética que permita transportar y liberar de manera progresiva en el núcleo de la epidermis cualquier tipo de ingrediente activo, ya sea hidrosoluble o liposoluble, que no presente los inconvenientes de los sistemas de encapsulación conocidos de la técnica anterior y que tenga además, como tal, una actividad intrínseca que pueda aprovecharse ventajosamente para el cuidado de la piel, y en particular para favorecer la regeneración de la dermis y de la epidermis.

35 Así, la presente invención tiene por objeto la utilización de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia para la encapsulación de al menos un ingrediente activo, y en particular de al menos un ingrediente activo desde un punto de vista cosmético.

40 Tiene también por objeto:

- 45 - las células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo;
- un procedimiento de preparación de dichas células;
- las composiciones cosméticas para aplicación tópica que comprende tales células;
- 50 - un procedimiento cosmético no terapéutico de tratamiento de la piel que utiliza tal composición cosmética, así como
- la utilización no terapéutica de una composición cosmética para aplicación tópica, que comprende tales células para el cuidado de la piel, y en particular para mejorar la firmeza de la piel, en particular favoreciendo la regeneración de la dermis y de la epidermis de la piel.

55 En efecto, los estudios efectuados por la compañía solicitante han mostrado que unas células desdiferenciadas y elicitadas de cultivo vegetal de buganvilia, cuando se aplican sobre la piel, se incorporan en las diferentes capas de la epidermis y tienen un efecto positivo sobre la proliferación de las células de la epidermis, favoreciendo así su regeneración y que estas mismas células permiten además transportar cualquier tipo de ingredientes activos y liberarse de manera progresiva en el núcleo de las diferentes capas de la dermis, ya sean estos ingredientes activos hidrosolubles o liposolubles, lo que mejora la eficacia. Además, a las dosis utilizadas, los ensayos efectuados han mostrado que las composiciones cosméticas a base de células desdiferenciadas de buganvilia utilizadas en la presente invención no presentan ninguna citotoxicidad.

65 La buganvilia es un género de arbusto de la familia de las *Nyctaginaceae*. Algunas especies se denominan buganvilia (feminino) o buganvilea (masculino), en particular *Bougainvillea glabra*, *Bougainvillea spectabilis* y

5 *Bougainvillea buttiana*. El primer espécimen de una de estas especies se descubrió por el botánico Philibert Commerson en Brasil, durante una expedición dirigida por el explorador francés Louis Antoine de Bougainville, del que toma su nombre. Las buganvilias son unos arbustos espinosos trepadores con colores vivos que, contrariamente a su apariencia, no se deben a las flores. Estas son pequeñas y blancas, y son las brácteas del extremo de las ramas que rodean las que ofrecen colores variados, rosa, rojo, malva, naranja, amarillo o blanco. Estos arbustos se utilizan ampliamente como plantas ornamentales en las regiones templadas cálidas, pero hasta la fecha, no se le conoce aplicación en cosmética.

10 Todas las especies de buganvilia pueden utilizarse según la invención, pero se pueden mencionar más particularmente *Bougainvillea glabra*, *Bougainvillea alba*, *Bougainvillea spectabilis*, *Bougainvillea infesta*, et *Bougainvillea buttiana*.

15 Por células vegetales desdiferenciadas de buganvilia, se entiende cualquier célula vegetal procedente de un cultivo *in vivo* de células de buganvilia, no presentando dichas células ninguno de los caracteres de una especialización particular y siendo capaces de vivir por sí mismas y no en dependencia con otras células.

20 Las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia utilizables según la presente invención se pueden obtener mediante técnicas conocidas de crecimiento o multiplicación celular, en medio líquido o sólido, de células de buganvilia cultivadas *in vitro* en un entorno controlado, en condiciones asépticas en ausencia de microorganismos.

25 La técnica del cultivo vegetal presenta la ventaja de producir unas células cultivadas en condiciones del entorno bien definidas y reproducibles, en lo que se refiere en particular a la temperatura, la luz y el medio de cultivo, y producir unas células no diferenciadas que se encuentran en el mismo estado fisiológico en un instante dado (desdiferenciadas). Otra ventaja es la formación de metabolitos secundarios en un tiempo más corto, del orden de una a tres semanas, que en la planta en la que este plazo es de varios meses.

Por ejemplo, se pueden preparar unas células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia a partir de explantes de hojas, de flores, del tallo o de la raíz.

30 Las células desdiferenciadas y obtenidas utilizables según la invención se pueden obtener mediante cualquier método conocido de la técnica anterior, tal como por ejemplo según los métodos descritos por E. F. George et P. D. Sherrington en *Plant Propagation by tissue culture, Handbook and Directory of Commercial Laboratories (Exegetics Ltd, 1984)*.

35 Los medios de cultivo utilizables según la invención son los generalmente conocidos por el experto en la materia. Se pueden citar en particular a título de ejemplo los medios de Gamborg, de Murashige Skoog, de Heller, de White, etc., y cuya descripción completa puede encontrarse en "Plant Culture Media: formulations and uses", E. F. George, DJM Puttock y H. J. George (Exegetics Ltd 1987, Tomos 1 y 2).

40 Se entiende por "elicitación" la realización de un estrés o de una agresión (biológica, química o física) sobre las células vegetales en su medio de cultivo a fin de provocar uno o más mecanismos de defensa que se concretan, en particular, pero no únicamente, por la síntesis de metabolitos secundarios de interés tales como las fitoalexinas.

45 Según la invención, la elicitación de las células desdiferenciadas de buganvilia en medio de cultivo se puede realizar por aplicación de agentes químicos o de estreses diversos tales como presión, depresión, vacío, variación de presión, presencia de un gas, atmósfera variable, calor, frío, luz, ciclos de luminosidad, radiaciones, toxinas, agitación, contaminación por microorganismos (bacterias, levaduras, virus), ultrasonidos, radiación infrarroja o ultravioleta, asfixia, etc.

50 Según la presente invención, se puede utilizar más particularmente unas células desdiferenciadas, elicitadas y liofilizadas de buganvilias. La liofilización de las células permite mejorar su conservación y, a continuación, facilitar su incorporación en las composiciones cosméticas.

55 Los elementos determinados en las células liofilizadas son los siguientes (para 100 g de células liofilizadas):

Proteínas (determinada según el método descrito en el decreto del 8 de septiembre de 1977 relativo a los métodos oficiales de análisis de los productos dietéticos y de régimen): 13,56g

60 El aminograma del extracto proteico ha demostrado los principales aminoácidos siguientes. A continuación, las cantidades en aminoácidos son indicadas en gramos para 100 g de células liofilizadas.

| | |
|-----------------|-------|
| Ácido aspártico | 10,61 |
| Ácido glutámico | 10,15 |
| Prolina | 6,75 |
| Lisina | 6,38 |
| Valina | 5,79 |

| | |
|--------------|------|
| Alanina | 5,29 |
| Serina | 5,27 |
| Glicina | 4,82 |
| Arginina | 4,72 |
| Glutamina | 4,63 |
| Isoleucina | 4,61 |
| Leucina | 4,60 |
| Fenilalanina | 4,25 |
| Treonina | 4,01 |
| Tarosina | 3,70 |
| Asparagina | 3,29 |
| Triptofano | 3,02 |
| Metionina | 2,58 |
| Cisteína | 1,89 |
| Ornitina | 0,24 |

5 Lípidos (determinados según el método descrito en el decreto del 8 de septiembre de 1977 relativo a los métodos oficiales de análisis de los productos dietéticos y de régimen): 1,08 g, que se compone en particular del 73% en masa aproximadamente de ácidos grasos saturados e insaturados de C₁₈ y de 21% en masa aproximadamente de ácidos grasos saturados de C₁₆.

Azúcares (determinados por cromatografía iónica – detección amperométrica pulsada PAD)):

| | |
|----------|----------|
| Glucosa | 11,23 g |
| Fructosa | 13,10 g |
| Lactosa | < 0,12 g |
| Sacarosa | 10,78 g |
| Maltosa | < 0,13 g |

10 Las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia utilizables según la invención se presentan en forma de vesículas que comprenden una membrana vegetal formada de una bicapa lipídica que delimita un volumen interno que contiene una fase encapsulada, generalmente acuosa. Se caracterizan por que al menos un ingrediente activo está presente en la fase encapsulada y/o dentro de la bicapa lipídica. Los constituyentes de la membrana son
15 idénticos a los lípidos inter-corneocitarios de la capa superior de la epidermis y a los lípidos intercelulares (ácidos grasos, ceramidas, colesterol). Así, después de la aplicación de las células desdiferenciadas y elicitadas conformes a la invención sobre la piel, el contenido celular se difundirá por simple cizallamiento de la piel; el o los ingredientes activos se benefician de una encapsulación natural y de una liberación por bio-mimetismo. Así, la acción de las células se efectúa en 3 fases, que son 1) la fragmentación de las membranas lipídicas de las células enteras, 2) la
20 inserción en los lípidos inter-corneocitarios y 3) la liberación progresiva del o de los ingredientes activos por bio-mimetismo dentro mismo de la capa córnea.

25 Las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia conformes a la invención permiten así encapsular y transportar hacia la capa córnea de la epidermis cualquier tipo de ingrediente activo, ya sea liposoluble o hidrosoluble.

En efecto, y en función de su afinidad para los medios hidrófilos o lipófilos, los ingredientes activos tendrán tendencia bien a incorporarse en las células vegetales a nivel de la membrana lipídica si son liposolubles, o bien en la fase encapsulada, si son hidrosolubles.

30 El o los ingredientes activos se pueden seleccionar por lo tanto entre cualquier tipo de compuesto habitualmente utilizado en las composiciones cosméticas. A título de ejemplo, se pueden citar los extractos de plancton, los extractos de origen vegetal tales como un extracto de maca (que tiene un efecto sobre la prevención de desajustes relacionados con una deficiencia de la microcirculación cutánea y al estrés oxidativo que puede resultar de ello), un extracto de pétalos de amapola que actúa sobre la nutrición celular, un extracto de azafrán (que tiene una acción
35 sobre la regeneración de la dermis y de la epidermis), una combinación de extractos de anchusa, de amapola y de pasiflora que, en asociación, tienen un efecto en la prevención de los signos del envejecimiento cutáneo, un extracto de semillas de mimosa, un extracto de pétalos de caléndula, un extracto de barbitamao, un extracto de kigelia africana, un extracto de avena, etc.

40 Según una forma de realización particularmente preferida de la invención, el ingrediente activo se selecciona entre los extractos vegetales, entre los cuales el extracto de azafrán es muy particularmente preferido. En efecto, los ensayos realizados por la solicitante han mostrado que, cuando se utilizaban las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia para encapsular y transportar un extracto de azafrán, los efectos de este extracto se amplificaban después de 2 horas de aplicación.

45 Entre los ingredientes activos que se pueden encapsular en las células de buganvilia conforme a la invención, se

5 pueden citar otros ejemplos tales como las vitaminas anti-oxidantes, tales como la vitamina E, por ejemplo el acetato de tocoferol o el tocotrienol, la vitamina C; los polifenoles naturales; el hexilresorcinol; los agentes antienvjecimiento, tales como, por ejemplo, un lípido como el geranil geranil isopropanol (Juvinity®) que reduce la formación de los peróxidos intracelulares y retrasa así el envejecimiento celular o el acetil-tetrapéptido-5 (CAS nº 820959-17-9).

La cantidad en ingrediente activo encapsulado varía generalmente del 0,01 al 5% en masa con respecto a la masa total de las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia, y aún más preferiblemente del 0,1 al 3% en masa.

10 Según la invención, la fase encapsulada es preferiblemente una fase acuosa selecciona entre el agua y los medios de cultivo utilizados para el cultivo *in vitro* de dichas células.

15 Otro objeto de la invención es un procedimiento de preparación de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo tal como se ha descrito anteriormente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

1) la preparación de células desdiferenciadas por cultivo *in vitro* en medio de cultivo de explantes de buganvilia,

20 2) la elicitación de las células desdiferenciadas obtenidas en la etapa anterior en el medio de cultivo,

3) la extracción de las células desdiferenciadas y puestas en evidencia obtenidas anteriormente en la etapa anterior.

25 caracterizándose dicho procedimiento por que comprende además una etapa 4) de encapsulación de al menos un ingrediente activo en unas células desdiferenciadas y elicitadas, realizándose esta etapa por incubación de las células desdiferenciadas y elicitadas obtenidas anteriormente en la etapa 3) con una solución o una dispersión de al menos un ingrediente activo en un medio líquido, dicha incubación.

30 La etapa 4) de incubación se realiza preferentemente a una temperatura inferior o igual a 30°C, y aún más preferiblemente a una temperatura que varía de 20 a 30°C, durante un tiempo de 12 a 48 horas aproximadamente.

El medio líquido utilizable para efectuar la incubación de las células desdiferenciadas y elicitadas con el o los ingredientes activos puede, por ejemplo, seleccionarse entre los medios utilizados en la etapa 1) del procedimiento para el cultivo *in vitro* de las células, es decir para la multiplicación celular de las células de buganvilia.

35 Al final de la incubación, las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo pueden recuperarse en el medio líquido, por ejemplo por filtración.

40 Según una forma de realización particularmente ventajosa de la invención, las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo se dispersan después en la glicerina para obtener una suspensión de células, antes de ser incorporadas en una composición cosmética, esto a fin de mejorar la conservación de las células a lo largo del tiempo.

45 Así, según una forma de realización preferida de la invención, las células desdiferenciadas y elicitadas que encapsulan al menos un ingrediente activo utilizable según la invención se presentan en forma de una suspensión de dichas células en la glicerina.

50 Dicha suspensión de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia en la glicerina constituye así otro objeto de la invención. Preferentemente, la cantidad de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia dentro de dicha suspensión varía del 15 al 30% en masa aproximadamente, y aún más preferiblemente es del orden del 20% en masa aproximadamente con respecto a la masa total de dicha suspensión.

55 La invención tiene también por objeto una composición cosmética para aplicación tópica caracterizada por que comprende, a título de ingrediente, unas células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo, y al menos un soporte cosméticamente aceptable.

60 De manera ventajosa, la composición cosmética conforme a la invención comprende del 0,001 al 10% en masa de una suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia en la glicerina y tal como se describe anteriormente, con respecto a la masa total de la composición cosmética, y aún más preferiblemente del 0,1 al 5% en masa.

En el sentido de la presente invención, se entiende por "soporte cosméticamente aceptable" los medios que comprenden agua, una mezcla de agua y uno o varios disolventes orgánicos o un disolvente o una mezcla de disolventes orgánicos cosméticamente aceptables.

65 Las composiciones cosméticas según la invención pueden contener, además de las células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo, uno o varios ingredientes

activos secundarios que refuerzan o complementan ventajosamente su actividad, y compatibles, es decir no susceptibles de reaccionar los unos con los otros u ocultar o limitar sus efectos. Tales ingredientes activos se pueden seleccionar, por ejemplo, entre los ingredientes activos que pueden encapsularse en las células vegetales de buganvilia y tales como se han mencionado anteriormente.

5 Las composiciones cosméticas conformes a la presente invención pueden presentarse en formas galénicas clásicamente utilizadas para una aplicación tópica, es decir en forma de gel, de emulsión (en particular crema o leche), de emulsión bifásica aceite en agua o agua en aceite, de aceite corporal, de mascarilla, de pomada, de unguento, de loción, de solución concentrada, conteniendo dichas formas galénicas además unos excipientes y soportes habituales y aceptables en el ámbito cosmetológico. Se utilizan preferentemente en forma de cremas, de sueros, de loción o de gel.

15 Estas formas de administración por vía tópica se preparan mediante las técnicas habituales, y por ejemplo, en el caso de una crema, por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa, para obtener una emulsión aceite en agua, o a la inversa, para preparar una emulsión agua en aceite. En el caso de cremas, se pueden utilizar unas emulsiones de estructura laminar obtenidas con unas lecitinas hidrogenadas o unos ésteres de sacarosa, que contienen pocos productos etoxilados o que no los contienen en absoluto.

20 Las composiciones tópicas según la invención pueden comprender unos excipientes apropiados para una aplicación tópica externa, en particular excipientes aceptables en el ámbito cosmetológico. Estos excipientes apropiados para la formulación son bien conocidos por el experto en la materia y comprenden en particular unos agentes de penetración tales como el fitantriol, el octildodecanol y el escino; los espesantes tales como las gomas naturales y los polímeros de síntesis; los tensioactivos; los emolientes tales como el octanoato de cetearilo, el miristato de isopropilo, el isononanoato de cetearilo, la dimeticona, la ciclometicona, el 3-diisoestearato de poliglicerilo, el poliisobuteno hidrogenado, el alcohol cetílico, el palmitato cetílico, el fosfato cetílico; los emulsionantes tales como unos derivados de poliglicerol; los conservantes tales como el fenoxietanol y el ácido deshidroacético; los colorantes; los perfumes; etc.

30 Como otros ingredientes utilizables en las composiciones de la invención, se pueden citar los agentes hidratantes tales como la glicerina, el butilenglicol, la sal de sodio del ácido pirrolidona carboxílico (sodium PCA), así como asociaciones de derivados glucósicos con efecto hidratante y reestructurante como el producto Aquaxyl® (xilitilglucósido y anhidroxilitol y xilitol), y también las vitaminas antioxidantes.

35 Se puede añadir también a la composición unos glúcidos seleccionados principalmente entre la glucosa, el glicógeno y la trehalosa, o también un palmitoil pentapéptido-3 tal como el Matrixyl® o unos derivados tales como el palmitoil GHK (que posee la cadena glicil-histidil-lisina) y el palmitoil GQPR (glicil-glutamil-prolil-arginina) o el palmitoil VGVAPG (valil-glicil-valil-alanil-prolil-glicina) asociado a una ceramida-2, así como de manera general cualquier asociación con una ceramida.

40 Se puede también añadir a la composición unos agentes de protección contra los rayos ultravioletas, y por ejemplo unos filtros solares YV-A y UV-B hidrófilos o lipófilos, o unos pigmentos que forman pantalla anti-ultravioleta.

45 Los filtros solares se pueden seleccionar entre, por ejemplo, la benzofenona o un derivado de benzofenona tal como la 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona (Eusolex® 4360), o un éster de ácido cinámico y más particularmente el metoxicinamato de octilo (Eusolex® 2292), el metoxicinamato de etil-2-hexilo (Parsol MCX®), o también un ciano- β,β -difetilacrilato tal como el octocrileno (Eusolex® OCR), el 4-metilbencilideno alcanfor (Eusolex 6300®), y sus derivados de dibenzoilmetano tales como el dibenzoilmetano de 4-isopropilo (Eusolex 8020), el t-butilmetoxidibenzoilmetano (Parso 1789®), y el 4-metoxi-dibenzoilmetano.

50 Los pigmentos se pueden seleccionar por ejemplo entre el dióxido de titanio, el óxido de zinc, y el óxido de circonio.

55 Las composiciones cosméticas para aplicación tópica de la invención permiten mejorar la penetración de los ingredientes activos dentro de la capa córnea de la epidermis y así mejorar su eficacia. Las células desdiferenciadas y elicadas de buganvilia tienen, por otro lado, un efecto positivo intrínseco sobre la proliferación de las células de la dermis y de la epidermis, que puede combinarse ventajosamente con el efecto del o de los ingredientes activos que encapsulan.

60 Así, la invención tiene por lo tanto también por otro objeto un procedimiento cosmético no terapéutico para los cuidados de la piel, en particular para mejorar la firmeza de la piel favoreciendo en particular la regeneración de la dermis y de la epidermis de la piel, caracterizado por que consiste en aplicar sobre las zonas de la piel en cuestión al menos una composición cosmética tal como se ha definido anteriormente, es decir una composición cosmética tópica que contiene una cantidad eficaz de células vegetales desdiferenciadas y elicadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo.

65 Finalmente, la invención tiene por objeto la utilización no terapéutica de una composición cosmética para aplicación

tópica que comprende unas células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo para los cuidados de la piel, en particular para mejorar la firmeza de la piel, en particular favoreciendo la regeneración de la dermis y de la epidermis de la piel.

5 La utilización cosmética de la composición cosmética conforme a la invención comprende todos los cuidados del cuerpo y de la piel incluyendo los productos solares, protectores y bronceadores, los productos anti-envejecimiento, anti-seborreicos, los tónicos, los productos que aseguran la mejora del aspecto de la piel, incluyendo el tratamiento del acné y las rojeces cutáneas.

10 Los ejemplos siguientes ilustran la invención más en detalle sin limitar su alcance. En todos los ejemplos de composiciones siguientes, las partes se expresan en masa, salvo que se indique lo contrario.

Ejemplos

15 EJEMPLO 1: Preparación de una suspensión de células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilia

1. Extracción y cultivo de las células desdiferenciadas de Buganvilia

20 Se recogieron trozos de hojas de aproximadamente 5 a 10 mm de hojas frescas de buganvilia (*Bougainvillea glabra*).

Los trozos de hojas se esterilizaron después, y después se pusieron en cultivo en cajas estériles a temperatura ambiente, sobre un medio nutritivo sintético (medio de Murashige y Skoog gelosado), hasta la formación, a nivel de los explantes, de cúmulos celulares desdiferenciados, denominados callos o célula madre.

25 Las células madres se extrajeron al final de 30 días, y después se trasplantaron sobre un medio nutritivo nuevo en las mismas condiciones de cultivo que anteriormente, hasta la obtención de callos friables.

Se ha obtenido así una colección de cepas desdiferenciadas estables que presentan unas características de crecimiento y de producción de metabolitos.

30

2. Elicitación de las células obtenidas anteriormente en la etapa anterior

La elicitación de las células se realizó por irradiación por luz UV a 180 nm durante 2 horas, con la ayuda de una luz Wilbert-Lourmat T-30C (600 $\mu\text{W}/\text{m}^2$), posicionada a una distancia de 1 m en iluminación directa por encima de las células.

35

3. Preparación de la suspensión celular

Después de la elicitación, se ha extraído un trozo de callo y se ha puesto en suspensión en un medio nutritivo líquido (medio de Murashige y Skoog sin gelosa).

40

Al final del cultivo (15 días), las células se filtraron para eliminar el medio de cultivo y después se aclararon con agua fría (4°C). Se obtuvo así una biomasa fresca de aproximadamente 250 g de células por litro de cultivo.

45 Las células se pusieron después en suspensión en glicerina vegetal, a razón de 20 g de células para 80 g de glicerina vegetal, es decir un 20% en masa. Se ha obtenido una suspensión de color beige-marrón.

EJEMPLO 2: Puesta en evidencia de la ausencia de citotoxicidad de la suspensión de células vegetales de buganvilia preparada en el ejemplo 1

50

En este ejemplo se ha ensayado la citotoxicidad eventual de la suspensión de células desdiferenciadas y elicidadas de *Bougainvillea glabra* tal como se obtuvo anteriormente mediante el procedimiento del ejemplo 1.

El ensayo se ha realizado *in vitro* sobre epidermis humana reconstruida ("*Reconstructed Human Epidermis*", RHE) modelo RHEps, de superficie 0,5 cm^2 , vendido por la compañía SkinEthic®.

55

La suspensión glicerizada de células obtenida anteriormente en el ejemplo 1 se ha ensayado después de la dilución al 0,5% con un medio de cultivo Murashige y Skoog sin gelosa en aplicación durante 24 horas sobre las epidermis, a razón de 2 μl por cm^2 .

60

Las imágenes histológicas (no representadas), obtenidas después de la coloración con hemateína/eosina/azafrán (HES), de las epidermis tratadas por la suspensión eran comparables con las de las epidermis de control que no han recibido ningún tratamiento.

65 Estos resultados son significativos de una ausencia de toxicidad cutánea.

EJEMPLO 3: Preparación de una suspensión de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán

5 En este ejemplo se ha preparado una suspensión de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan un extracto de flores de azafrán (*Crocus sativus*) a título de ingrediente activo.

El extracto de azafrán se obtuvo de flores de azafrán después de la extracción de los estigmas. Las flores sin estigmas se secaron, se redujeron en polvo y después se extrajeron con agua por maceración.

10 Unas células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia tales como se prepararon anteriormente en el ejemplo 1 se pusieron en suspensión en un medio nutritivo líquido (medio de Murashige y Skoog sin gelosa) que contiene un 1% en masa de extracto de azafrán. La incubación de las células de Buganvilia se ha realizado durante 48 horas, a una temperatura de 25°C a fin de encapsular el extracto de azafrán en la fase acuosa de las células.

15 Al final del periodo de incubación, las células de Buganvilia se recuperaron por filtración y después se pusieron en suspensión en glicerina a razón del 20% en masa para un 80% en masa de glicerina.

20 Se obtuvo así una suspensión que comprende un 80% en masa de glicerina, un 20% en masa de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan el extracto de azafrán.

EJEMPLO 4: Puesta en evidencia de la incorporación de las células desdiferenciadas de Buganvilia en las diferentes capas de la epidermis

25 En este ejemplo se ha estudiado la aptitud de las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia para penetrar en las diferentes capas de la epidermis a fin de suministrar el ingrediente activo encapsulado.

4.1. Principio del ensayo

30 El principio del ensayo se basa en la utilización de la proteína verde fluorescente (conocida también bajo la denominación inglesa "Green Fluorescent Protein" o GFP), a fin de visualizar el paso de las células de Buganvilia en las diferentes capas de la epidermis.

4.2. Protocolo

35 Se han añadido 5 mM de GFP a la suspensión de células vegetales de *Bougainvillea glabra* preparada anteriormente en el ejemplo 1. La mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera que contiene un 5% de CO₂.

40 También se preparó una composición a 5 mM de GFP en un medio de cultivo Murashige y Skoog sin gelosa.

El estudio se ha realizado sobre unas epidermis humanas reconstruidas *in vitro*, de modelo RHEps, fabricadas por la compañía SkinEthic. Se han repartido en 3 lotes (n=4, es decir 4 epidermis por lote):

45 Lote 1: 4 epidermis no tratadas;

Lote 2: 4 epidermis tratadas por la GFP sola;

Lote 3: 4 epidermis tratadas con células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de Buganvilia incubadas con GFP.

50 A su recepción, las epidermis se transfirieron en placas de 12 pocillos que contenían un medio de cultivo para epidermis vendido por la compañía SkinEthic (0,5 ml/pocillo) y se colocaron en la incubadora a 37°C, en una atmósfera al 5% de CO₂ saturada de humedad, durante 24 horas antes de proceder al tratamiento de los tejidos.

55 Se aplicaron tópicamente 2 µl/cm² de cada muestra a ensayar (Solución de GFP sola o Suspensión de células incubadas con GFP) sobre las epidermis (superficie de las epidermis: 0,5 cm²). Después del tratamiento, las epidermis se sustituyeron en estufa a 37°C y se incubaron durante 2 horas (2 epidermis por lote) o durante 12 horas (2 epidermis por lote) en atmósfera aire/CO₂ (95%/5%: v/v).

60 Después de la incubación, las epidermis se fijaron en una solución de formaldehído al 10% y después se incluyeron en unos bloques de parafina. Se realizaron unos cortes verticales de 4 µm con micrótopo, después se observaron y fotografiaron bajo un microscopio óptico de fluorescencia (Zeiss).

4.3. Resultados

65 Los resultados obtenidos se detallan en la figura 1 anexa que da una fotografía de una epidermis tratada por la solución de GFP sola después de 12 horas de incubación (figura 1a), la fotografía de una epidermis tratada durante

2 horas con la suspensión de células desdiferenciadas de buganvilia previamente incubadas con GFP (figura 1b), así como la fotografía de una epidermis tratada durante 12 horas con la suspensión de células desdiferenciadas de buganvilia previamente incubadas con GFP (figura 1c). En estas figuras, las flechas blancas indican las células de buganvilia hechas fluorescente por la GFP y su incorporación en la capa de la epidermis.

5 Estos resultados muestran que el tratamiento de las epidermis por la solución de GFP sola no induce a ningún paso de esta última, no habiéndose observado ningún marcado fluorescente dentro de las diferentes capas de la epidermis, estando concentrada la mayoría de la fluorescencia en la capa córnea (figura 1a).

10 Por el contrario, refiriéndose a las epidermis tratadas con la suspensión de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia previamente incubadas con GFP durante 2 horas (figura 1b), se observa un paso de la proteína. En efecto, se observa un marcado fluorescente dentro de la epidermis, lo que demuestra la presencia de la GFP y por lo tanto la incorporación de las células vegetales en las diferentes capas de la epidermis (capa granulosa y capa espinosa).

15 El tratamiento de las epidermis durante 12 horas con la suspensión de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia previamente incubadas con GFP (figura 1c) conduce también a un marcado fluorescente, observándose este en todas las capas, lo que es significativo de la incorporación de las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia tanto a nivel de las capas granulosa y espinosa como de la capa basal.

20 Así, este ejemplo demuestra que las células desdiferenciadas preparadas según la invención pueden penetrar a través de las diferentes capas de la epidermis para alcanzar la capa basal y transportar en ella un ingrediente activo encapsulado por analogía a la encapsulación con GFP.

25 Ejemplo 5: Evaluación del efecto de las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán sobre la regeneración de la epidermis

5.1 Principio del ensayo

30 El ensayo se basa en la evaluación inmunohistológica del índice de proliferación Ki-67 a fin de estimar el efecto de las células desdiferenciadas de buganvilia sobre el potencial de renovación celular de la lámina basal de la epidermis.

35 En efecto, el antígeno Ki-67 pertenece a unos marcadores de proliferación. Este antígeno está presente en una proteína nuclear de 360 kDa (número de acceso P46013) presente en las células proliferativas. El antígeno Ki-67 se describió por Gerdes J *et al.* en 1983 después de la inmunización de ratones por inyección de núcleos de células de linfoma que proviene de un linfoma de Hodgkin (Gerdes J. *et al.*, International Journal of Cancer, 1983, Volumen 31, publicación 1, páginas 13-20).

40 Está presente a nivel del núcleo de las células proliferativas, en fase G₁, S, G₂ y M y ausente en las células en ciclo de reposo (fase G₀). Su función precisa no es conocida, sin embargo, se sugiere una participación en el mantenimiento del poder proliferativo o en el control del ciclo celular.

45 El antígeno Ki-67 puede detectarse por un anticuerpo Ki-67, a saber el anticuerpo monoclonal MIB-1 (compañía R&D Systems) en inmunohistoquímica. En la práctica, el índice de marcado por el Ki-67 representa el porcentaje de núcleos coloreados por el anticuerpo MI1-B.

5.2 Protocolo

50 El estudio se ha realizado sobre epidermis humanas reconstruidas *in vitro*, de modelo RHEps, fabricadas por la compañía SkinEthic. Se han repartido en 4 lotes (n = 4, es decir 4 epidermis por lote):

Lote 1: 4 epidermis no tratadas;

55 Lote 2: 4 epidermis tratadas con la suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de Buganvilia preparada anteriormente en el ejemplo 1, después de la dilución al 0,5% con un medio nutritivo líquido (medio de Murashige y Skoog sin gelosa), a razón de 2 µl/cm², a 37°C, bajo una atmósfera al 5% CO₂ durante 24 horas;

60 Lote 3: 4 epidermis tratadas con un extracto de azafrán al 1% no encapsulado, es decir con un medio nutritivo líquido (medio de Murashige y Skoog sin gelosa) que contiene un 1% en masa de extracto de azafrán, a razón de 2 µl/cm², a 37°C, bajo una atmósfera al 5% CO₂ durante 24 horas;

65 Lote 4: 4 epidermis tratadas con la suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán preparada anteriormente en el ejemplo 3, a razón de 2 µl/cm², a 37°C, bajo una atmósfera al 5% CO₂ durante 24 horas.

Las epidermis de los lotes 1 a 4 se fijaron después en una solución de formaldehído al 10%, después se incluyeron en unos bloques de parafina. Se realizaron unos cortes verticales de 5 µm con micrótopo. Se pusieron después cada uno de los cortes en contacto con una solución de anticuerpo monoclonal MI1-B según el protocolo indicado por el proveedor R&D Systems. La revelación se realizó mediante el método peroxidasa-anti peroxidasa después del desenmascaramiento antigénico por pretratamiento con calor también según el protocolo indicado por R&D Systems. El marcado por cromógeno DAB (diamino-3,3'-benzidina tetraclorhidrato) revela en marrón los sitios nucleares KI-67 de la fracción de células en crecimiento expresadas en fases G₁ y S (Fase de latencia y síntesis de la célula); G₂ (Fase de desdoblamiento de los constituyentes celulares) y M (mitosa).

El índice de proliferación KI-67 de las epidermis tratadas por las células vegetales desdiferenciadas de Buganvilia se evaluó por recuento de los sitios nucleares coloreados, a razón de 10 campos por lámina, con microscopio óptico, aumento x 250, comparativamente a los cortes de las epidermis de control no tratadas. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1

| | Número de células coloreadas | Diferencia con respecto al control (%) |
|--|------------------------------|--|
| Epidermis controles (Lote 1) | 16,5 ± 3 | - |
| Epidermis tratadas por las células de buganvilia (Lote 2) | 20,8 ± 0,8 ¹ | + 26 |
| Epidermis tratadas por el extracto de azafrán solo (Lote 3) | 18,8 ± 0,5 | + 13 |
| Epidermis tratadas por las células que encapsulan el extracto de azafrán (Lote 4) | 22,4 ± 0,2 | + 35 |

¹: Significativamente diferente con respecto al control, p<0,05 (“Wilcoxon Rank Sum Test”)

Estos resultados muestran que el tratamiento de las epidermis por las células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia induce ya a un aumento de la proliferación celular y por lo tanto tiene un efecto positivo sobre la regeneración de la epidermis. Estos ensayos muestran también que la encapsulación del extracto de azafrán por las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia ha inducido también un aumento significativo de la proliferación de las células de la capa basal (+35%) y que esta proliferación es mucho más intensa que la observada después del tratamiento de las epidermis con el extracto de azafrán solo (lote 3) o que después de un tratamiento con las células de buganvilia solas (lote 2).

EJEMPLO 6: Evaluación del efecto de las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán sobre la regeneración de la dermis

6.1 Principio del ensayo

El ensayo se basa en la evaluación por inmunomarcado en fluorescencia del colágeno I a fin de estimar el efecto de las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán sobre la síntesis de colágeno I y así sobre el potencial de renovación de la dermis.

6.2 Protocolo

El estudio se ha realizado sobre unos fibroblastos de dermis humana NHDFs (Normal Human Dermal Fibroblasts; origen: prepucio) a aproximadamente un 40% de su potencial proliferativo y cultivados en monocapa en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) que contiene suero fetal de ternera (“*Fetal Bovine Serum*”: FBS) y antibióticos (penicilina/estreptomina).

Las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37°C que contiene un 5% de CO₂.

A fin de evaluar los efectos sobre la síntesis de colágeno I, los fibroblastos NHDFs se han inoculado sobre láminas de vidrio (compartimientos de 0,7 cm²), 24 horas antes del principio del tratamiento por las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán. Se han constituido cinco lotes:

Lote 1: control, que no recibe ningún producto

Lote 2: control positivo. Se ha utilizado una solución de TGF-β1 a 20 ng/ml como molécula de referencia que permite aumentar la síntesis de colágeno I dentro de los fibroblastos NHDFs.

Lote 3: los fibroblastos se han tratado con un 3% de una suspensión de células vegetales elicitadas y desdiferenciadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán, preparadas según el mismo procedimiento que el descrito anteriormente en el ejemplo 3.

Lote 4: los fibroblastos se han tratado con un 1% de una suspensión de células vegetales elicidadas y desdiferenciadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán, tal como se han preparado anteriormente en el ejemplo 3.

5 Lote 5: los fibroblastos se han tratado con 0,3% de una suspensión de células vegetales elicidadas y desdiferenciadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán, preparadas según el mismo procedimiento que el descrito anteriormente en el ejemplo 3.

10 Las células vegetales elicidadas y desdiferenciadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán se han solubilizado en el medio de cultivo que no contiene suero y se pusieron en contacto con los fibroblastos durante 48 horas. Cada condición se ha realizado por triplicado (n=3).

15 Al final de los tratamientos, los fibroblastos se fijaron con formol y después se aclararon con PBS. Las láminas se conservaron después a 4°C hasta el día del marcado.

20 El inmunomarcado en fluorescencia del colágeno I se ha realizado incubando las láminas con un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína. El DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol), una molécula fluorescente capaz de unir el ADN, se ha utilizado para marcar los núcleos. Las láminas se han montado finalmente con alcohol polivinílico (producto vendido bajo la denominación comercial Mowiol® por la compañía Aldrich) y almacenadas a 4°C.

La cuantificación se ha realizado en base de 3 fotografías por réplica tomadas con la ayuda de un microscopio Leica® (DM 2000, objetivo 40x) y de una cámara Leica® (DFC420C).

25 El marcado en inmunofluorescencia del colágeno I se ha cuantificado con la ayuda del programa QWin 3® (Leica) utilizando el píxel como unidad de superficie (1 píxel = 1 μm^2). Cada fotografía está constituida de 4751460 píxeles. La intensidad media del marcado se ha determinado para cada fotografía. Los núcleos se contaron gracias al programa *ImageJ* a fin de detallar la superficie marcada y la intensidad media del marcado al número de núcleos sobre cada fotografía. Esta relación, que permite determinar la intensidad del marcado, se compara con el valor correspondiente a la condición control no tratada.

6.3 Resultados

35 Los resultados se presentan en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2

| Condición | Marcado en inmunofluorescencia del colágeno I | Diferencia con respecto al control (%) |
|------------------|---|--|
| Lote 1 (control) | 386497 ± 5 | - |
| Lote 2 | 1 833 434 ± 92 | +374 |
| Lote 3 | 677 881 ± 9 | + 75 |
| Lote 4 | 578 891 ± 53 | + 50 |
| Lote 5 | 534 275 ± 23 | + 38 |

40 Estos resultados muestran que el tratamiento de los fibroblastos por las células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán, con diferentes concentraciones ensayadas al 3%, 1% y 0,3%, induce a un aumento del marcado en inmunofluorescencia del colágeno I (respectivamente +75%, +50%, y +38% con respecto al control).

45 Se puede deducir de ello, por lo tanto, que la aplicación de células desdiferenciadas y elicidadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán permite aumentar la síntesis de colágeno I, y así tiene un efecto positivo sobre la regeneración de la dermis.

Ejemplo 7: Puesta en evidencia de las propiedades de las células vegetales de buganvilia conformes a la invención sobre la viabilidad y la respiración celular

50 En este ejemplo, se han evaluado las propiedades de la suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán tal como se ha preparado anteriormente en el ejemplo 3, sobre la viabilidad y la respiración celular, así como sobre el metabolismo energético.

55 7.1 Principio del ensayo

La actividad de la suspensión de células vegetales del ejemplo 3 sobre el metabolismo celular y respiratorio se ha evaluado por la metabolización de la glucosa por las células de la epidermis en condiciones de hipoxia. Las condiciones de hipoxia *in vitro* conllevan unas alteraciones profundas de las funciones electromecánicas celulares,

acompañadas de un aumento de la producción de lactato, de una caída de los contenidos en adenosina trifosfato (ATP) y en adenosina difosfato (ADP), y de una fuga de lactato deshidrogenasa (LDH). La reoxigenación de las células hipoxiadas (en una fase reversible) normaliza la pérdida de lactato, conlleva una resíntesis de ATP y una atenuación de la liberación de LDH. En efecto, la respiración celular es una reacción química de oxidorreducción que tiene lugar en las mitocondrias y que proporciona la energía necesaria para que una célula funcione. La respiración celular hace intervenir el ciclo de Krebs y necesita un carburante, que es principalmente la glucosa y que procede de la glicólisis anaeróbica, así como un comburante que es el dioxígeno (O₂). Esta reacción produce principalmente un dióxido de carbono (CO₂) y agua.

Así, para demostrar estos efectos a nivel de la epidermis, se han evaluado la respiración y la viabilidad de las células mediante la determinación de la liberación de ¹⁴CO₂ después del tratamiento de las células de las epidermis por el [¹⁴C]-glucosa-6-fosfato (SIGMA ALDRICH) según un protocolo que permite seguir un proceso celular dinámico y conocido bajo la denominación en inglés "pulse/chase".

7.2 Protocolo del ensayo

El ensayo se ha efectuado *in vitro* sobre epidermis humanas reconstruidas ("Reconstructed Human Epidermis", RHE) modelo RHEps, de superficie 0,5 cm², vendidas por la compañía SkinEthic®. Se han repartido en 3 lotes (n = 4, es decir 4 epidermis por lote):

Lote 1: epidermis control negativo que no recibe ningún producto y ningún tratamiento;

Lote 2: epidermis control positivo que no recibe ningún producto y un tratamiento de asfixia durante 24 horas;

Lote 3: 4 epidermis tratadas con la suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán preparada anteriormente en el ejemplo 3 y previamente diluida al 0,5% con un medio de cultivo Murashige y Skoog sin gelosa, en aplicación tópica durante 24 horas sobre las epidermis, a razón de 2 µl por cm² durante 24 horas y tratamiento de asfixia durante 24 horas.

Cabe señalar que, en los experimentos anteriores, la asfixia de las epidermis se obtuvo por incubación de las epidermis, al vacío, en cajas cerradas herméticamente durante todo el tiempo del tratamiento (24 horas).

7.3 Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3 siguiente, expresándose la cantidad de ¹⁴CO₂ liberado en ciclos por minuto (cpm):

Tabla 3

| | Cantidad de ¹⁴ CO ₂ liberada (cpm) | Diferencia con respecto al control (%) |
|--|--|--|
| Epidermis control negativo (Lote 1) | 1845 ± 112 | - |
| Epidermis control positivo (asfixia) (Lote 2) | 1098 ± 105 ¹ | - 40 |
| Epidermis tratadas por las células que encapsulan el extracto de azafrán + asfixia (Lote 3) | 1496 ± 93 ² | + 36 |

¹: Significativamente diferente con respecto al control negativo p<0,05 ("Wilcoxon Rank Sum Test")

²: Significativamente diferente con respecto al control positivo p<0,05 ("Wilcoxon Rank Sum Test")

Estos resultados revelan que la aplicación de las células de buganvilia conformes a la invención conlleva un aumento significativo de liberación de ¹⁴CO₂ en las condiciones de asfixia con respecto al control positivo. Se puede deducir por lo tanto que la aplicación de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán permite aumentar significativamente el metabolismo energético celular, y así tiene un efecto positivo sobre la viabilidad de las células que constituyen la epidermis.

Ejemplo 8: Puesta en evidencia de la liberación progresiva del extracto después de la aplicación de las células de buganvilia conformes a la invención

En este ejemplo, se ha estudiado la cinética de liberación del extracto de azafrán encapsulado en las células vegetales desdiferenciadas y elicitadas tales como se han preparado anteriormente en el ejemplo 3, después de la aplicación sobre la epidermis, en comparación con la aplicación de un extracto de azafrán solo, es decir no encapsulado en unas células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia.

8.1 Principio del ensayo

Al igual que en el ejemplo anterior, la cinética de liberación del extracto de azafrán se ha estudiado y evaluado por la determinación de la liberación de ¹⁴CO₂ después del tratamiento de las células de las epidermis por el [¹⁴C]-glucosa-

6-fosfato.

8.2. Protocolo del ensayo

5 El ensayo se ha efectuado *in vitro* sobre epidermis humanos reconstruidos (“*Reconstructed Human Epidermis*”, RHE) modelo RHEps, de superficie 0,5 cm², vendidas por la compañía SkinEthic®. Se han repartido en 12 lotes (n = 4, es decir 4 epidermis por lote):

Tratamiento de las epidermis durante 2 horas:

- 10 Lote T2-1: epidermis control negativo que no recibe ningún producto y ningún tratamiento;
- Lote T2-2: epidermis control negativo que no recibe ningún producto y un tratamiento de asfixia durante 2 horas;
- 15 Lote T2-3: epidermis tratadas con una solución al 1% en masa de extracto de azafrán en un medio nutritivo líquido (medio de Murashige y Skoog sin gelosa), en aplicación tópica durante 2 horas sobre las epidermis, a razón de 2 µl por cm² y tratamiento de asfixia durante 2 horas;
- 20 Lote T2-4: epidermis tratadas con la suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán preparada anteriormente en el ejemplo 3 y previamente diluida al 0,5% con un medio de cultivo Murashige y Skoog sin gelosa, en aplicación tópica durante 2 horas sobre las epidermis, a razón de 2 µl por cm² y tratamiento de asfixia durante 2 horas.

Tratamiento de las epidermis durante 6 horas:

- 25 Lote T6-1: epidermis control negativo que no recibe ningún producto y ningún tratamiento;
- Lote T6-2: epidermis control negativo que no recibe ningún producto y un tratamiento de asfixia durante 6 horas;
- 30 Lote T6-3: epidermis tratadas con una solución al 1% en masa de extracto de azafrán en un medio nutritivo líquido (medio de Murashige y Skoog sin gelosa), en aplicación tópica durante 6 horas sobre las epidermis, a razón de 2 µl por cm² y tratamiento de asfixia durante 6 horas;
- 35 Lote T6-4: epidermis tratadas con la suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán preparada anteriormente en el ejemplo 3 y previamente diluida al 0,5% con un medio de cultivo Murashige y Skoog sin gelosa, en aplicación tópica durante 6 horas sobre las epidermis, a razón de 2 µl por cm² y tratamiento de asfixia durante 6 horas.

Tratamiento de las epidermis durante 12 horas:

- 40 Lote T12-1: epidermis control negativo que no recibe ningún producto y ningún tratamiento;
- Lote T12-2: epidermis control negativo que no recibe ningún producto y un tratamiento de asfixia durante 12 horas;
- 45 Lote T12-3: epidermis tratadas con una solución al 1% en masa de extracto de azafrán en un medio nutritivo líquido (medio de Murashige y Skoog sin gelosa), en aplicación tópica durante 12 horas sobre las epidermis, a razón de 2 µl por cm² y tratamiento de asfixia durante 12 horas;
- 50 Lote T12-4: epidermis tratadas con la suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán preparada anteriormente en el ejemplo 3 y previamente diluida al 0,5% con un medio de cultivo Murashige y Skoog sin gelosa, en aplicación tópica durante 12 horas sobre las epidermis, a razón de 2 µl por cm² y tratamiento de asfixia durante 12 horas.

8.3 Resultados

55 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4 siguiente, expresándose la cantidad de ¹⁴CO₂ liberada expresada en ciclo por minuto (cpm):

Tabla 4

| | Cantidad de ¹⁴ CO ₂ liberada (cpm) | | | | | |
|-----------------------------------|--|--|-----------------------|--|------------------------|--|
| | 2 horas de incubación | Diferencia con respecto al control (%) | 6 horas de incubación | Diferencia con respecto al control (%) | 12 horas de incubación | Diferencia con respecto al control (%) |
| Epidermis control negativo | 1532 ± 42 | - | 1598 ± 35 | - | 1612 ± 87 | - |

| | | | | | | |
|---|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|
| Epidermis control positivo (asfixia) | 1385 ± 12 ¹ | - 9 | 1245 ± 28 ¹ | - 22 | 1095 ± 53 ¹ | - 32 |
| Epidermis tratadas con el extracto de azafrán no encapsulado + asfixia | 1395 ± 29 | ns | 1352 ± 57 | ns | 1295 ± 49 ² | + 18 |
| Epidermis tratadas por las células que encapsulan el extracto de azafrán + asfixia | 1662 ± 61 ² | + 20 | 1556 ± 21 ² | + 25 | 1445 ± 51 ² | + 32 |

¹: Significativamente diferente con respecto al control negativo p<0,05 (“Wilcoxon Rank Sum Test”)

²: Significativamente diferente con respecto al control positivo p<0,05 (“Wilcoxon Rank Sum Test”)

5 Estos resultados muestran que el extracto de azafrán aplicado solo, es decir, sin estar encapsulado en las células vegetales de Buganvilia induce ya a un efecto significativo pero débil (+ 18) sobre la liberación del CO₂ (Lote T12-3) cuando el tiempo de incubación es de 12 horas. Por el contrario, cuando el extracto de azafrán está encapsulado en las células de Buganvilia, se observa un efecto significativo sobre la liberación del CO₂, a partir de las 2 horas de incubación (+20%), con una amplificación a lo largo del tiempo (+25% después de 6 horas de incubación y +32% después 12 horas de incubación) demostrando una liberación progresiva del extracto de azafrán en el núcleo de la epidermis.

EJEMPLO 9: Puestas en evidencia del efecto de las células vegetales de Buganvilia conformes a la invención sobre el grosor de la epidermis

15 En este ejemplo se han evaluado los efectos de la suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas que encapsulan un extracto de azafrán tal como se han preparado anteriormente en el ejemplo 3, sobre el grosor de la epidermis.

Protocolo del ensayo

20 El ensayo se ha efectuado *in vitro* sobre epidermis humanas reconstruidas (“Reconstructed Human Epidermis”, RHE) modelo RHEps, de superficie 0,5 cm², vendidas por la compañía SkinEthic®. Se han repartido en 2 lotes (n = 4, es decir 4 epidermis por lote):

25 Lote 1: 4 epidermis control no tratadas,

Lote 2: 4 epidermis tratadas con la suspensión de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de Buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán preparada anteriormente en el ejemplo 3 y previamente diluida al 0,5% con un medio de cultivo Murashige y Skoog sin gelosa, en aplicación tópica durante 24 horas sobre las epidermis, a razón de 2 µl por cm² durante 24 horas.

30 Al final del tratamiento, es decir después del contacto con las células de Buganvilia, las epidermis del lote 2, así como las epidermis no tratadas del lote 1, se han fijado en una solución de formaldehído al 10%, después se incluyeron en bloques de parafina. Se han realizado unos cortes verticales de 4 µm con micrótopo y después se han coloreado con hematoxilina/eosina según las técnicas conocidas por el experto en la materia.

El grosor de las epidermis se ha determinado mediante un analizador de imagen (Zeiss) bajo microscopio óptico (Zeiss), con un aumento de 40 veces.

40 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5 siguiente:

Tabla 5

| | Grosor medio (µm) | Diferencia con respecto al control (%) |
|--|--------------------------|---|
| Epidermis control (Lote 1) | 137 ± 12 | - |
| Epidermis tratadas por las células que encapsulan el extracto de azafrán (Lote 2) | 162 ± 9 ¹ | + 18 |

¹: Significativamente diferente con respecto al control, p<0,05 (“Wilcoxon Rank Sum Test”)

45 Estos resultados ponen en evidencia que la aplicación de las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan un extracto de azafrán sobre las epidermis conllevan un aumento significativo de su grosor.

5 El conjunto de los resultados presentados en los ejemplos anteriormente demuestra que las células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan el extracto de azafrán conformes a la invención inducen a una estimulación cutánea. Esta última se ha observado a nivel de todos los compartimientos epidérmicos, de manera espaciada en el tiempo. En efecto, las células de buganvilia que encapsulan el extracto de azafrán han inducido un aumento del grosor de la epidermis y un refuerzo de la densidad por una clara proliferación de las células basales. Estas actividades se deben a la estimulación del metabolismo celular y respiratorio de las células de la epidermis.

10 Por otro lado, y a pesar de que estos efectos se hayan demostrado seleccionando un extracto de azafrán a título de ingrediente activo, son generalizables a cualquier otro ingrediente activo que tengan propiedades interesantes para los cuidados de la piel en la medida en la que las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia utilizadas en esta invención presentan como tales unas propiedades de regeneración de la dermis y de la epidermis y permiten encapsular y liberar cualquier tipo de ingrediente activo de manera progresiva en el núcleo de las diferentes capas de la epidermis y así potenciar sus efectos.

15 Ejemplo 10: suero para el cuidado de la piel

20 Mediante las técnicas habituales, se ha preparado un suero para el cuidado de la piel que tiene la composición másica indicada a continuación.

| | |
|---|--------------|
| Glutamato diacetato tetrasódico | 0,07 g |
| Butilenglicol de origen vegetal vendido bajo la denominación comercial Zemea [®] por la compañía DKSH | 5,00 g |
| Goma xantana | 0,07 g |
| Hidroxietilcelulosa | 0,30 g |
| Lecitina hidrogenada | 1,00 g |
| Triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico vendidos bajo la denominación comercial Myritol [®] 318 por la compañía BASF | 3,00 g |
| Estearoil-2-lactilato de sodio | 0,20 g |
| Gliceril undecilenato | 0,50 g |
| Tetraisopalmitato de ascorbilo | 0,10 g |
| Sal de sodio del ácido dihidroacético | 0,10 g |
| Hialuronato de sodio | 0,15 g |
| Trealosa | 1,00 g |
| Fucosa | 0,50 g |
| Suspensión de células vegetales que encapsulan un extracto de azafrán tal como se prepara en el ejemplo 3 anterior | 2,00 g |
| Almidón de tapioca (mandioca) | 0,35 g |
| Perfume | 0,10 g |
| Agua desmineralizada | csp 100,00 g |

Este suero está destinado a fortalecer y regenerar la piel y puede utilizarse de una a dos veces por día.

25 Ejemplo 11: Crema anti-envejecimiento

Mediante las técnicas habituales, se ha preparado una crema anti-envejecimiento que tiene la composición másica siguiente:

| | |
|--|--------|
| Glutamato diacetato tetrasódico | 0,10 g |
| Butilenglicol de origen vegetal vendido bajo la denominación comercial Zemea [®] por la compañía DKSH | 5,00 g |
| Glicerina vendida bajo la denominación comercial Glicerina Bio por la compañía IES | 8,00 g |
| Betaína | 2,00 g |
| Hidroxietilcelulosa | 0,50 g |
| Dehidroacetato de sodio | 0,15 g |
| Emulsionante laminar natural compuesto de fosfolípidos y de lípidos vegetales, vendido bajo la denominación comercial Biophilic [®] H por la compañía Lucas Meyer Cosmetics | 4,00 g |
| Gliceril estearato citrato | 0,80 g |
| Escualano de origen vegetal vendido bajo la denominación comercial Phytosqualane por la compañía Sophim | 5,00 g |
| Triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico vendidos bajo la denominación comercial Myritol [®] 318 por la compañía BASF | 7,00 g |
| Alcohol butílico | 1,00 g |
| Alcohol behenílico | 0,75 g |
| Aceite de Macadamia | 2,00 g |
| Aceite de carité oleico vendido bajo la denominación comercial Beurre de <i>Vitellaria</i> | 4,00 g |

ES 2 686 502 T3

| | |
|--|--------------|
| <i>nilotica</i> por la compañía Olvea | |
| Gliceril undecilenato | 0,50 g |
| Tetraisopalmitato de ascorbilo | 0,25 g |
| Suspensión de células vegetales que encapsulan un extracto de azafrán tal como se ha preparado en el ejemplo 3 anteriormente | 5,00 g |
| Geranil geranil propanol vendido bajo la denominación comercial Juvinity® por la compañía Sederma | 2,00 g |
| Perfume | 0,25 g |
| Hialuronato de sodio | 0,20 g |
| Trealosa | 1,00 g |
| Mezcla de palmitoil oligopéptido y de palmitoil-tetrapéptido-7 vendida bajo la denominación comercial Matrixyl® 3000 por la compañía Sederma Corp. | 3,00 g |
| Agua desmineralizada | Csp 100,00 g |

Esta crema anti-envejecimiento se puede utilizar una a dos veces por día por aplicación sobre las zonas de la piel a tratar.

5 Ejemplo 12: Loción tónica refrescante

Mediante las técnicas habituales, se ha preparado una loción tónica refrescante que tiene la composición másica siguiente:

| | |
|--|--------------|
| Butilenglicol de origen vegetal vendido bajo la denominación comercial Zemea® por la compañía DKSH | 5,00 g |
| Ácido galacturónico | 0,10 g |
| Ácido anísico | 0,10 g |
| Mezcla de ácido levulínico y de levulinato de sodio vendida bajo la denominación comercial Dissolvine® GL 38 por la compañía AkzoNobel | 0,30 g |
| Sal de sodio del ácido pirrolidona carboxílico (Sodium PCA) | 0,50 g |
| Agua de menta picante (compañía Herbarom) | 10,00 g |
| Agua de melisa (compañía Herbarom) | 10,00 g |
| Agua de tilo (compañía Herbarom) | 10,00 g |
| Agua de Rosa Centifolia (compañía Herbarom) | 25,00 g |
| Extracto de flores de caléndula | 1,00 g |
| Suspensión de células vegetales que encapsulan un extracto de azafrán tal como se ha preparado en el ejemplo 3 anteriormente | 1,00 g |
| Agua de romero (compañía Herbarom) | 3,00 g |
| Agua desmineralizada | csp 100,00 g |

10 Esta loción tónica refrescante se puede utilizar de una a dos veces por día por aplicación sobre las zonas de la piel a tratar.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de Buganvilia para la encapsulación de al menos un ingrediente activo.
- 10 2. Células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de Buganvilia que se presentan en forma de vesículas que comprenden una membrana vegetal formada de una bicapa lipídica que delimita un volumen interno que contiene una fase encapsulada, caracterizadas por que al menos un ingrediente activo está presente en dicha fase encapsulada y/o dentro de dicha bicapa lipídica.
- 15 3. Células según la reivindicación 2, caracterizadas por que el ingrediente activo se selecciona entre un extracto de plancton, un extracto de maca, un extracto de pétalos de amapola, un extracto de azafrán, una combinación de extractos de amapola y de pasiflora, un extracto de semillas de mimosa, un extracto de pétalos de caléndula, un extracto de barbitamao, un extracto de kigelia africana y un extracto de avena.
- 20 4. Células según la reivindicación 2 o 3, caracterizadas por que el ingrediente activo es un extracto de azafrán.
- 25 5. Células según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizadas por que la cantidad en ingrediente activo encapsulado varía del 0,01 al 5% en masa con respecto a la masa total de las células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia.
- 30 6. Células según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizadas por que la fase encapsulada es una fase acuosa.
- 35 7. Suspensión de células vegetales de Buganvilia en glicerina, caracterizada por que dichas células vegetales son unas células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia tal como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 40 8. Suspensión según la reivindicación 7, caracterizada por que la cantidad de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia dentro de dicha suspensión varía del 20 al 30% en masa con respecto a la masa total de dicha suspensión.
- 45 9. Procedimiento de preparación de células desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo tales como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
- 50 1) preparar las células desdiferenciadas por cultivo *in vitro* en medio de cultivo de explantes de Buganvilia,
- 55 2) elicitar las células desdiferenciadas obtenidas en la etapa anterior en el medio de cultivo,
- 60 3) extraer las células desdiferenciadas y elicitadas obtenidas anteriormente en la etapa anterior,
- 65 caracterizándose dicho procedimiento por que comprende además una etapa 4) de encapsulación de al menos un ingrediente activo en unas células desdiferenciadas y elicitadas, realizándose esta etapa por incubación de las células desdiferenciadas y elicitadas obtenidas anteriormente en la etapa 3) con una solución o una dispersión de al menos un ingrediente activo en un medio líquido, dicha incubación.
- 70 10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que el medio líquido utilizable para efectuar la incubación de las células desdiferenciadas y elicitadas con el o los ingredientes activos se selecciona entre los medios utilizados en la etapa 1) de dicho procedimiento para el cultivo *in vitro* de dichas células.
- 75 11. Composición cosmética para aplicación tópica, caracterizada por que comprende, a título de ingrediente, unas células vegetales desdiferenciadas y elicitadas de buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo, tal como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, y al menos un soporte cosméticamente aceptable.
- 80 12. Composición según la reivindicación 11, caracterizada por que comprende del 0,001 al 10% en masa de una suspensión de células vegetales desdiferenciadas de Buganvilia en glicerina tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
- 85 13. Composición según la reivindicación 11 o 12, caracterizada por que se presenta en forma de gel, de emulsión, de emulsión bifásica aceite en agua o agua en aceite, de aceite corporal, de máscara, de pomada, de ungüento, de loción o de solución concentrada.
- 90 14. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizada por que comprende además unos agentes de protección contra los rayos ultravioletas o unos pigmentos que forman pantalla anti-ultravioleta.

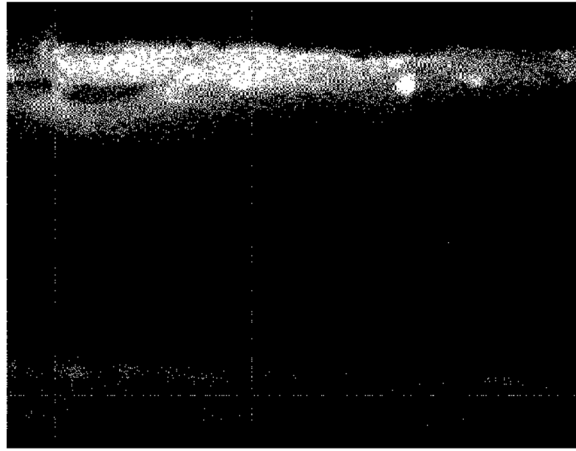
15. Procedimiento cosmético no terapéutico para los cuidados de la piel, caracterizado por que consiste en aplicar sobre las zonas de la piel en cuestión al menos una composición cosmética tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14.

5

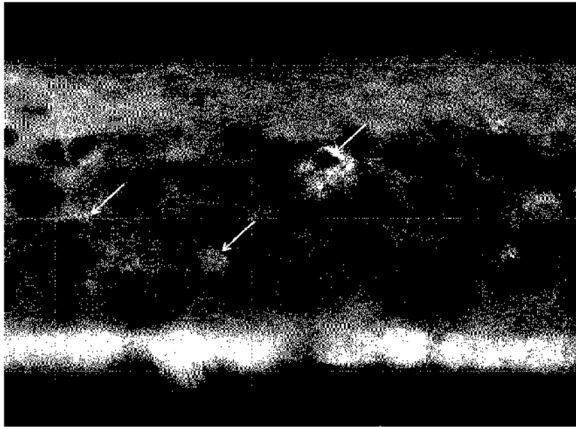
16. Utilización no terapéutica de una composición cosmética para aplicación tópica que comprende unas células vegetales desdiferenciadas y elicidadas de Buganvilia que encapsulan al menos un ingrediente activo y tales como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 para los cuidados de la piel.

10

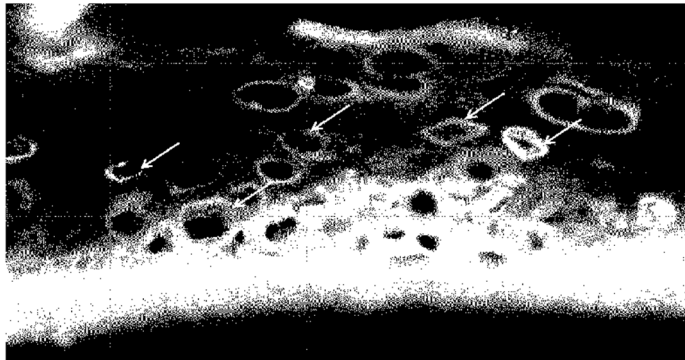
Figura 1



a



b



c