

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 038**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61K 8/9789 (2007.01)
A61Q 1/02 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61Q 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2021** **PCT/EP2021/063690**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2021** **WO21234159**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2021** **E 21728208 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023** **EP 3980123**

54 Título: **Extracto de semillas de moringa peregrina rico en 2,5-diformilfuran, procedimiento para su obtención y su uso en composiciones cosméticas**

30 Prioridad:

21.05.2020 FR 2005429
17.03.2021 FR 2102686

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.02.2024

73 Titular/es:

**AGENCE FRANCAISE POUR LE
DÉVELOPPEMENT D'ALULA (100.0%)**
82 rue de Courcelles
75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

**DODINET, ELIZABETH y
BOURGATEAU, VINCENT**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 960 038 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

Extracto de semillas de moringa peregrina rico en 2,5-diformilfuran, procedimiento para su obtención y su uso en composiciones cosméticas

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere al campo de la cosmética y la nutricosmética y más particularmente al de los principios activos utilizados en la formulación de composiciones para el cuidado de la piel. La invención se refiere a un extracto de semillas de *Moringa peregrina* rico en el compuesto 2,5-diformilfuran (DFF). La invención también se refiere al procedimiento de obtención de un extracto particular de las semillas de *Moringa peregrina*, a las composiciones cosméticas que comprenden dichos extractos, y finalmente al uso cosmético o nutricosmético de dichas composiciones para el cuidado de la piel, cuero cabelludo y faneras.

Antecedentes tecnológicos

- 15 Las Moringaceae son una familia monogenérica (un solo género, *Moringa* Adans), elemento de la flora sahara-india, que consta de entre doce y catorce especies, según los autores, distribuidas desde el este de África hasta Asia. El género se divide clásicamente en 3 secciones que, sin embargo, no están confirmadas como mono-filéticas por análisis filogenéticos. En cambio, estos últimos cladogramas bastante destacados se centraron en ciertos caracteres morfológicos: paquicaules ("bottle trees"); árboles tuberosos ("tuberous trees"); y ni paquicaules ni árboles tuberosos ("en inglés "slender trees"). La especie *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, pertenece al tercer grupo. Los pocos estudios genéticos sobre el género o la familia confirman la realidad de la especie en relación con otras especies del género, especialmente con respecto a la *Moringa* india, *Moringa oleifera* Lam. (ver en particular los artículos: OLSON M. E. 2002, Combining Data from DNA Sequences and Morphology for a Phylogeny of Moringaceae (Brassicales), Systematic Botany 27(1): 55-73; HASSANEIN A. M. A. Y AL-SOQEE, A. A., 2018, Morphological and genetic diversity of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* genotypes, Horticulture, Environment and Biotechnology 59(2): 251-261). Un artículo reciente sobre *Moringa peregrina* muestreada de diferentes localidades de Arabia Saudita concluyó, utilizando sus marcadores ITS, que la especie era genéticamente estable (ALAKLABI A., 2015, Genetic diversity of *Moringa peregrina* species in Saudi Arabia with ITS sequences, Saudi Journal of Biological Sciences 22 (en inglés): 186-190) con, sin embargo, un alto nivel de variación genética dentro de las poblaciones.

- 30 La especie *Moringa peregrina* se encuentra en ambientes rocosos en Yemen, Omán y Arabia Saudita, África Oriental, Sudán, y otros países. En Etiopía, Eritrea, Somalia y Yibuti. Su presencia en Irán parece estar limitada a las provincias del sudeste, pero necesita ser confirmada (PROTA14 =MUNYANZIZA E. Y YONGAB1 K. A., aceites vegetales/oleaginosos, *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, http://database.prota.org/protahtml/moringa_peregrina_en.htm, consultado 23/10/2019). En el Levante y Egipto, la especie representa, hoy en día, solo raras estaciones dispersas y relictuosas (con la excepción de algunos rodajes altitudinales), principalmente en las áreas de la cordillera sudanesa. La *Moringa peregrina* también se considera rara y está en peligro hoy en Sudán y Yemen. *Moringa peregrina* ocupa los hábitats más áridos e inhóspitos en comparación con las otras especies de su clado. Aparentemente es más resistente a la sequía que la *Moringa oleifera*, que se planta comercialmente a gran escala en áreas tropicales y subtropicales. Trabajos recientes han demostrado que el tamaño y tamaño de las semillas tienen un impacto positivo en el tiempo de germinación y la velocidad y velocidad de crecimiento de los individuos jóvenes (GOMAA N. H. Y PICÓ F. X., 2011, Seed germination, seedling traits, and seed bank of the tree *Moringa peregrina* (Moringaceae) in a hyper-arid environment, American Journal of Botany 98(6): 1024-1030), indicando un ajuste en la asignación de recursos en la calidad de las semillas en lugar del número, permitiendo a la *Moringa peregrina* reproducirse eficazmente en ambientes abióticos extremos (hiperáridos). Las semillas de *Moringa peregrina* tienen una mesotesta central más gruesa, en términos de capa celular, que las de *M. oringaoleifera*.

- 45 Hay algunos registros históricos que tienden a indicar que el aceite de *Moringa peregrina* fue objeto de comercio activo en los primeros años del Islam en la región de AlUia (NASEEF, A.S.A., 1995, Al-Ula, A study of Cultural and Social Heritage). El aceite producido localmente a partir de *Moringa peregrina* está hoy destinado principalmente al autoconsumo o a los mercados locales. En Arabia Saudita, las hojas se usaban tradicionalmente en decocción interna para tratar la diabetes, las enfermedades del colon, las enfermedades oculares y la anemia (ABDEL-KADER M. S., HAZAZAZI A. M. A., ELMAKKI O. A. Y ALQASOUMI S. I., 2018, A survey on the traditional plants used in Al Kobah village, Saudi Pharmaceutical Journal 26(6): 817-821) y como diurético, rubefaciente y astringente (AQEEL A. M., TARIQ M., M. OSSA J. S., AL-Yahya M. A. ET AL-Salo M. S., 1984, "Plants used in Arabia Folk medicine ", Report submitted to Saudi Arabian National Centre for Science and Technology, Riad, Arabia Saudita). En Omán, el aceite, extraído por las mujeres al final del verano, se utiliza contra las migrañas, fiebre, quemaduras, laceraciones y fracturas, estreñimiento y dolor de estómago, dolor muscular y sequedad del cabello, dolor de parto (GHAZANFAR S. A., 1994, Manual de Plantas Medicinales Árabes Handbook of Arabian Medicinal Plants, 1ª ed., CRC Press, Boca Ratón, Ann Harbor, s.u. ;GHAZANFAR S.A., 1998, Plants of Economic Importance, cap. 15, in G HAZANFAR, S.A. Y FISHER, M. (ed.) Vegetación de la Península Arábiga. Geobotany 25, pp. 241-264, Kluwer Academic Publishers, Tabla 11,1, pp. 247 y 11,7, p. 251). También se utilizó en composiciones perfumadas (GHAZANFAR S.A., 1998, p. 259)) y en Omán y Yemen como loción facial (GHAZANFAR S.A. Y RECHINGER B., 1996, Two multi-purpose seed

oils from Oman. Plants for Food and Medicine. Paper presented at the joint meeting of the Society for Economic Botany and International Society for Ethnopharmacology, 1-7 de julio de 1996, Londres).

Los extractos procedentes de la semilla de *Moringa oleifera* son conocidos en el campo cosmético. Por ejemplo, el documento FR296879 revela un extracto de semillas enteras (con tegumentos) de *Moringa oleifera* que contiene aceite (incluyendo triglicéridos, ácidos grasos y lípidos polares) y polifenoles y su uso en composiciones cosméticas para combatir el envejecimiento de la piel. En este documento, es la parte apolar de la semilla de *Moringa oleifera* la que aparece como activa, y más particularmente la parte aceitosa. También se sabe a partir del documento FR2776519 que los extractos proteicos de las semillas de *Moringa oleifera*, conocidos por sus efectos clarificantes sobre las aguas turbias, tienen sobre la piel y las membranas mucosas un efecto suavizante, fisiológico, hidratante, reestructurante y reparador y como un agente activo anti-contaminación. En este documento, los principios activos son proteínas con pesos moleculares de entre 6.500 y 8.800 Da que se obtienen por extracción acuosa en torta de *Moringa oleifera*. También se conoce el documento FR3076460, que se refiere al uso de un extracto proteico de una semilla de *Moringa oleifera* no germinada y enriquecida para el tratamiento de la piel sensible, sensibilizada, reactiva, frágil y/o debilitada y/o membranas mucosas y/o para el tratamiento y/o prevención del eritema, en particular la erupción del pañal en lactantes. En este documento, el procedimiento de extracción permite obtener una fracción importante de proteínas cuyos pesos moleculares son aproximadamente 8.800 Da. El uso de un extracto germinado de semilla entera de *Moringa oleifera* en cosméticos, en particular obtenido por extracción utilizando un fluido supercrítico, también se conoce en el documento KR20130088224. Este procedimiento permite aislar carotenoides y aminoácidos apolares que se describen como agentes activos para el uso cosmético blanqueador. Todos los documentos antes mencionados se refieren al uso de la especie *Moringa oleifera*, ninguno describe el uso en el campo cosmético de la especie *Moringa peregrina*. En el documento de Kolheilet *al.*, XP055753955, 2011, la extracción con etanol de compuestos polifenólicos bioactivos, taninos, flavonoides, saponinas, esteroides insaturados y/o triterpenos se revela en todas las semillas de *Moringa peregrina*. El extracto obtenido se almacena a 4° C y tiene un efecto antioxidante. En el documento de Abbas Albaet *al.*, XP055753970, 2018, se divulga sobre las semillas enteras de *Moringa peregrina* una extracción etanólica durante tres días y más. La concentración de los filtrados se obtiene bajo presión reducida a una temperatura de entre 45 y 50 °C. En el documento de Abou-Hashem *et al.*, XP055754018, 2019, la extracción etanólica durante tres veces 72 horas se revela en todas las semillas de *Moringa peregrina*. El extracto obtenido se filtra y concentra con un evaporador rotativo a una temperatura de aproximadamente 45 °C. En el documento de Majali Ibrahimel *al.*, XP055754048, 2015, se revela la extracción con etanol con agitación durante media hora y luego precipitación durante 72 horas en todas las semillas de *Moringa peregrina*. Ninguno de los documentos anteriores revela la extracción etanólica sobre la torta de la semilla no descascarillada de *Moringa peregrina*.

Más específicamente, para la especie *Moringa peregrina*, se sabe que ciertos compuestos fenólicos y flavonoides obtenidos de las hojas o semillas enteras de *Moringa peregrina* exhiben actividad antioxidante (AL-DABBAS M., 2017, Antioxidant activity of different extracts from the aerial part of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, from Jordan, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 30(6): 2151-2157). Estos compuestos se extraen con disolventes como metanol, acetato de etilo o hexano de hojas enteras o semillas. Parece que son las hojas las que contienen los compuestos más activos.

Por lo tanto, dependiendo de la especie utilizada en el género *Moringa*, se observa que dependiendo de la parte de las plantas (hoja, semilla), la parte de las semillas (enteras o no, descascarilladas o no) y el procedimiento de extracción utilizado, en particular la elección del solvente, las moléculas extraídas resultan ser diferentes. Ahora, la composición del extracto condiciona la actividad biológica y, en consecuencia, la eficacia cosmética.

Considerando lo anterior, un problema que la invención propone resolver es desarrollar productos novedosos a partir de un extracto de la especie *M. peregrina* del género *Moringa* que pueden ser utilizados en cosmética y que son fáciles de implementar.

Como resultado, el solicitante ha demostrado un extracto novedoso obtenido de semillas y más específicamente de la torta de semillas de la especie *Moringa peregrina*, que exhibe en particular una actividad relajante y anti-estrés de la piel, una actividad anti-envejecimiento así como una actividad preventiva de tareas de vejez. El extracto según la invención es rico en 2,5-diformilfuran (DFF), un compuesto también llamado 2,5-furandicarboxaldehído. El extracto se obtiene específicamente de las semillas o más específicamente de la torta de las semillas no descascarilladas de *Moringa peregrina*, en particular por extracción alcohólica. El extracto según la invención es novedoso en dos aspectos en el campo de la cosmética en comparación con los extractos de la técnica anterior, por un lado por la especie específica de origen utilizada y por otro lado por su contenido de compuestos particulares.

Por acuerdo intergubernamental del 10 de abril de 2018 entre el Gobierno de la República Francesa y el Reino de Arabia Saudita, la demandante, Agencia Francesa para el Desarrollo d'AIUIA (AFALULA) y la Real Comisión para AIUIA (RCU) tienen un proyecto común, en particular para desarrollar la agricultura responsable y la economía local, Especialmente a través de la producción local de productos naturales derivados de plantas nativas y para proteger la biodiversidad y los derechos de la región de AIUIA del Reino de Arabia Saudita. El Reino de Arabia Saudita es miembro del Protocolo de Nagoya desde el 8 de octubre de 2020. En el momento de la redacción de esta patente, se está considerando el Reglamento en virtud del cual el Protocolo de Nagoya se incorporará a los aspectos pertinentes de la legislación local. Por lo tanto, en esta etapa, el Reino de Arabia Saudita no tiene requisitos

específicos con respecto a esta solicitud de patente y al Protocolo de Nagoya. Por lo tanto, en la fecha de presentación de la solicitud de patente, no hay requisito de un certificado de cumplimiento con respecto al acceso a los recursos genéticos.

Sumario

5 El primer objeto de la invención es un extracto de las semillas de *Moringa peregrina* rico en el compuesto 2,5-diformilfuran. El compuesto 2,5-diformilfuran es un compuesto óseo raro en el reino vegetal y sintetizado a partir de furfural a través de la síntesis intermedia de 5-hidroximetilfural.

Debido a su característica, una concentración rica en 2,5-diformilfuran, el extracto según la invención es único en el género *Moringa*. Se demostrará que la especie *Moringa peregrina* tiene un perfil molecular particular diferente de los
10 conocidos por las otras especies del género, en particular la especie *Moringa oleifera*, que el solicitante ha podido demostrar.

El segundo objeto de la invención es un procedimiento para obtener un extracto de las semillas de *Moringa peregrina* según la invención, que comprende las siguientes etapas según las cuales:

- 15 A) las semillas no descascarilladas de *Moringa peregrina* se recogen y secan para obtener un contenido de humedad interna inferior al 8 %;
- b) las semillas secas se prensan para separar el aceite del resto de la semilla para obtener la torta,
- c) la torta obtenida en la etapa b) se tritura,
- d) el triturado obtenido en la etapa c) se dispersa en una proporción de aproximadamente el 25 % en peso del material sólido en relación con el peso total utilizado en un disolvente predominantemente alcohólico, el alcohol
20 se elige de etanol o metanol con opcionalmente un codisolvente de poliol o agua subcrítica, en una proporción del 80 al 100 % en peso de alcohol con respecto al peso total del disolvente;
- e) se realiza una extracción sólido-líquido, con agitación, a una temperatura de entre 16 y 30 °C durante un período de aproximadamente 2 horas,
- f) las fases líquida y sólida se separan para eliminar la fase sólida y recuperar un extracto líquido de torta
25 *Moringa peregrina*, y
- g) opcionalmente, el extracto líquido de *Moringa peregrina* obtenido se seca para obtener un extracto sólido de *Moringa peregrina*.

El tercer objeto de la invención es una composición cosmética o nutricosmética que comprende, como agente activo, una cantidad efectiva de un extracto de semilla de *Moringa peregrina* según la invención y un excipiente fisiológicamente aceptable.
30

Finalmente, el cuarto objeto de la invención es el uso cosmético o nutricosmético de una composición según la invención, para mejorar la apariencia de la piel, las membranas mucosas o las faneras, para relajar, calmar y desestresar la piel y para prevenir y/o combatir los signos cutáneos del envejecimiento y/o fotoenvejecimiento, para evitar tareas de vejez.

35 Breve descripción de las figuras

Se entenderá mejor la invención, y otros objetos, detalles, características y ventajas de la misma se harán más evidentes en el curso de la siguiente descripción de varias realizaciones particulares de la invención, dadas únicamente a modo de ilustración no limitativa.

Descripción de las realizaciones

40 En esta descripción, a menos que se especifique lo contrario, se entiende que, cuando se da un intervalo, incluye los límites superior e inferior de dicho intervalo.

En la presente invención, las siguientes abreviaturas significan:

- MTT: Bromuro de 3-(45-dimetiltiazol-2-IL)-2,5-difenil tetrazolio (el ensayo MTT es un procedimiento rápido para contar células vivas)
- SDS: Sulfato de dodecil sódico
- PBS: Fosfato Buffet-Salino
- ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- ANOVA: Análisis de varianza
- MSH: Hormona estimulante de melanocitos

En la presente invención, la expresión:

- 5
- «extracto rico en 2,5-diformilfurano»: un extracto que contiene una cantidad de compuesto de 2,5-diformilfurano mayor que los demás ingredientes identificados, es decir, una cantidad superior al 50 % basada en la materia seca del extracto total.
 - “cantidad efectiva” significa la cantidad de moléculas activas necesarias para obtener el resultado deseado, es decir, para hacer posible, en particular, obtener protección de la matriz extracelular de la piel.
- 10
- por «aplicación tópica» se entiende el hecho de aplicar o difundir el principio activo según la invención, o una composición que lo contenga, en la superficie de la piel, de una mucosa o de las faneras.
 - “fisiológicamente aceptable”, que es adecuado para uso tópico en contacto con la piel humana, o para uso por otras vías de administración, por ejemplo, oral o inyección en la piel, sin riesgo de toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica.
- 15
- “torta” significa la parte desgrasada de la semilla después de presionar. Este es el residuo sólido de la extracción de aceite de las semillas. Es un co-producto de la trituración, el procedimiento de fabricación de aceite. Por lo general, representa entre el 50 y el 75 % de la masa de la semilla.
 - “semillas no descascarillada” significa el hecho de que la cáscara, o pericarpio, de las semillas cosechadas se mantiene alrededor de las semillas.
- 20
- “a la madurez del fruto” significa el hecho de que el fruto está maduro, preferiblemente cuando la vaina está al comienzo de la dehiscencia y que asume una coloración beige oscuro a marrón y cuando una torsión ejercida por 180° en el cuarto inferior de la vaina hace que comience la apertura de las válvulas.
 - por «disolvente predominantemente alcohólico» se entiende el hecho de que el disolvente de tipo alcohólico puede comprender un codisolvente con características suficientes para extraer el principio activo, sabiendo
- 25
- que el etanol puro 96 parece ser el disolvente alcohólico más adecuado.
 - “alrededor de” un margen más o menos del 10 % al 20 % en relación con la información dada (duración, porcentaje..).
 - “molécula activa”, también “principio activo”, significa la molécula de 2,5-diformilfurano extraída de acuerdo con el procedimiento de la invención de las semillas de *Moringa peregrina*. Esta molécula es responsable
- 30
- de las actividades biológicas descritas en la presente invención.
 - «agente activo» significa una cantidad suficiente de un extracto según la invención para obtener las actividades biológicas descritas. Dependiendo de si el extracto es líquido o seco, concentrado o no, las cantidades de agente activo pueden variar en proporciones de 0,002 a 20 % en peso con respecto al peso total de la composición.
- 35
- “signos del envejecimiento de la piel” significa cualquier cambio en la apariencia externa de la piel y en las faneras debido al envejecimiento, como, por ejemplo, líneas finas, piel borrosa, piel suave, piel delgada, falta de elasticidad y/o tono de la piel, piel opaca y no radiante o manchas de pigmentación en la piel, decoloración del cabello o manchas en las uñas, pero también cualquier cambio interno en la piel que no siempre resulta en una apariencia externa modificada como, por ejemplo, Cualquier degradación interna de
- 40
- la piel debido a la exposición a la radiación ultravioleta (UV).

La invención se refiere, en primera instancia, a un extracto de semillas de *Moringa peregrina* rico en el compuesto 2,5-diformilfurano. La molécula de 2,5-diformilfurano, también conocida como 2,5-furandicarboxaldehído, nunca se ha caracterizado en un extracto de semillas de especies del género *Moringa*. La especie *Moringa peregrina* crece en climas muy áridos. Por lo tanto, su capacidad para resistir la sequía le ha permitido adquirir características particulares únicas, que el solicitante ha podido identificar mediante la implementación de un procedimiento de extracción adecuado en semillas enteras o preferiblemente en torta de semillas.

En el contexto de la presente invención, la parte vegetal elegida es la semilla de *Moringa peregrina*. Se sabe que las semillas de *Moringa peregrina* se utilizan para la extracción de su aceite llamado aceite peregrina (nombre del INCI “*Moringa peregrina* seed oil”), utilizado regionalmente para el autoconsumo o en diversas indicaciones medicinales

tradicionales. La torta obtenida después de que la semilla ha sido desaceitada es un residuo actualmente utilizado para la alimentación animal en particular.

Según el primer objeto de la invención, el extracto de *Moringa peregrina* se obtiene mediante extracción sólido-líquido de la torta de las semillas no descascarilladas, con agitación, en una proporción de aproximadamente el 25 % en peso de materia sólida con respecto al peso total utilizado en un disolvente predominantemente alcohólico. El alcohol que se elija a partir de etanol o metanol con opcionalmente un codisolvente de poliol o agua subcrítica, en una proporción de 70 a 100 % en peso de alcohol en relación con el peso total del disolvente, a una temperatura de entre 16 y 30 °C durante un período de aproximadamente 2 horas, Y al separar las fases líquida y sólida para eliminar la fase sólida y recuperar un extracto líquido de semilla de *Moringa peregrina*, dicho extracto es rico en el compuesto 2,5-diformilfuran. Preferiblemente, el extracto según la invención se obtiene de la torta de las semillas cosechadas a la madurez del fruto de *Moringa peregrina* después de la extracción del aceite *peregrina* (nombre del INCI "Moringa peregrina seed oil").

Cabe señalar que el principio activo del extracto según la invención, es decir, 2,5-diformilfuran, es una molécula de polaridad mixta que exhibe una cierta fragilidad. Así, el extracto obtenido de la semilla entera no descascarillada deberá someterse a una extracción selectiva para obtener una alta concentración de principios activos, utilizando disolventes y co-solventes adecuados y una temperatura no superior a 30° C.

Los co-disolventes pueden ser, por ejemplo, éteres de glicol (mono o di-propilenglicol, propanediol y otros derivados de propilenglicol, derivados de etileno o dietilenglicol), glicerol, éter dimetil isosorbida, ésteres de metilo o etilo o propilo de ácidos grasos; carbonato de dicaprilil, éter de dicaprilil, acetato de alquilo o propionato, acetona, metil o etilo cetona, monoterpenos como alfa-pineno o limoneno. Las proporciones de estos codisolventes se pueden mezclar con el disolvente primario (p. ej Etanol o metanol) de 0 a 30 % (V/V).

Las condiciones de extracción pueden estar bajo presión atmosférica o bajo vacío o bajo una atmósfera inerte, pero preferiblemente en la oscuridad a una temperatura de entre 16 y 30 ° C.

En una realización preferente según la invención, el extracto se obtiene de la torta de las semillas no descascarilladas por extracción sólido-líquido, con un solvente alcohólico etanol 96°.

En otra realización, el extracto líquido obtenido se seca para obtener un extracto seco de la torta de las semillas de *Moringa peregrina* que contiene más del 50 % en peso de 2,5-diformilfuran en relación con el peso total de la materia seca.

El extracto seco de la torta de las semillas de *Moringa peregrina* contiene más precisamente alrededor del 55 % en peso de 2,5-diformilfuran, 2,5 % de furfural, 1,2 % de miristato de isopropilo, 4,7 % de ácido palmítico, 11,1 % de ácido oleico y 25,8 % de triglicéridos en relación con el peso total de la materia seca.

El segundo objeto de la invención es un procedimiento para obtener un extracto de semillas de *Moringa peregrina* según la invención, que comprende las siguientes etapas según las cuales:

a) las semillas no descascarilladas de *Moringa peregrina* se recogen y secan para obtener un contenido de humedad interna inferior al 8 %;

b) las semillas secas se prensan para separar el aceite del resto de la semilla para obtener la torta,

c) la torta obtenida en la etapa b) se tritura,

d) el triturado obtenido en la etapa c) se dispersa en una proporción de aproximadamente el 25 % en peso del material sólido en relación con el peso total utilizado en un disolvente predominantemente alcohólico, el alcohol se elige de etanol o metanol con opcionalmente un codisolvente de poliol o agua subcrítica, en una proporción del 70 al 100 % en peso de alcohol con respecto al peso total del disolvente;

e) se realiza una extracción sólido-líquido, con agitación, a una temperatura de entre 16 y 30 °C durante un período de aproximadamente 2 horas,

(f) se separan las fases líquida y sólida para eliminar la fase sólida y se recupera un extracto líquido de torta de *Moringa peregrina*, y

g) opcionalmente, cuando el alcohol es etanol, el extracto líquido de *Moringa peregrina* obtenido se seca para obtener un extracto sólido de *Moringa peregrina*.

En una realización preferente, las semillas no descascarilladas, es decir, cuya cáscara se conserva, se recogen a la madurez del fruto y preferiblemente cuando la vaina está al comienzo de la dehiscencia.

En una realización preferente, las semillas se secan para obtener un contenido de humedad interna de alrededor del 6 %, el secado se lleva a cabo preferiblemente en un estante ventilado lejos de los rayos del sol, preferiblemente bajo la sombra al aire libre.

Las semillas secas se trituran extemporáneamente mediante prensado en frío, lo que permite separar mecánicamente el aceite peregrina (nombre del INCI "Moringa peregrina seed oil") del resto de la semilla comprimida, es decir, la torta.

5 La torta se tritura mecánicamente con cualquier tipo de trituradoras mecánicas, como un martillos, mayales, cuchillos, sistema de aplastamiento/trituración.

La extracción se realiza ventajosamente siempre con agitación, permitiendo así la dispersión y homogeneización del sólido en el líquido, mejorando la difusión del soluto en el disolvente.

10 Para extraer la mayoría del compuesto de 2,5-diformilfuran de interés, se preferirá un disolvente alcohólico de tipo etanol a 96°, pero también se puede utilizar metanol, con un cosolvente de tipo poliol o con agua subcrítica. Al final de la extracción, la materia vegetal residual agotada del compuesto de interés se separa ventajosamente de la fase líquida mediante filtración clarificante. Aún más preferiblemente, el disolvente es etanol a 96°. Un extracto líquido se obtendrá ventajosamente de la torta de semillas de *Moringa peregrina* que comprende entre el 0,5 % y 1,6 % de materia seca, siendo esta materia seca compuesta por al menos 50 % de 2,5-diformilfuran, lo que corresponde aproximadamente entre 0,25 % y 0,8 % en peso del peso total del extracto líquido.

15 En una realización del procedimiento de obtención según la invención, el extracto líquido de *Moringa peregrina* obtenido se purifica mediante destilación, microfiltración, ultrafiltración y/o nanofiltración para concentrar el extracto en el compuesto 2,5-diformilfurano de interés con respecto a los materiales orgánicos también extraídos, en particular al resto del material extraído, como las sustancias grasas y los derivados también extraídos. Estas etapas de purificación permiten concentrar el compuesto de interés a expensas de otros compuestos extraídos como se mencionó y del disolvente.

20 En otra realización del procedimiento de producción según la invención, El extracto líquido obtenido se seca para obtener un extracto seco de la torta de las semillas de *Moringa peregrina* que contiene más del 50 % en peso del compuesto 2,5-diformilfuran de interés en relación con el peso total de la materia seca extraída.

25 Según una realización ventajosa de la invención, cuando el solvente es etanol, el extracto líquido de semillas de *Moringa peregrina* obtenido se seca preferentemente, por ejemplo por atomización, liofilización o zeodración, para obtener un extracto sólido de torta de semillas de *Moringa peregrina*, evaporándose el etanol. El secado puede realizarse en presencia de un soporte orgánico como maltodextrina, ciclodextrina o inulina, o en presencia de un soporte inorgánico como filosilicato, silicato de magnesio o carbonato y sus sales.

30 La invención también se refiere al extracto de las semillas de *Moringa peregrina* que se pueden obtener por el procedimiento de obtención según la invención.

El tercer objeto de la invención es una composición cosmética o nutracosmética que comprende, como agente activo, una cantidad efectiva de un extracto de semillas de *Moringa peregrina* según la invención, y un excipiente fisiológicamente aceptable.

35 La composición según la invención puede formularse en forma de diversas preparaciones adaptadas para la administración tópica o para la administración oral.

Según una primera variante, las diversas preparaciones se adaptan para la administración tópica e incluyen cremas, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, leches, ungüentos, lociones, aceites, aceites, y otros productos. bálsamos, soluciones acuosas o acuosas-alcohólicas o glicólicas, sueros, polvos, parches, aerosoles o cualquier otro producto para aplicación externa, como, por ejemplo, dispositivos médicos o productos cosméticos-textiles.

40 Según una segunda variante, las diversas preparaciones se adaptan para la administración oral; el extracto de planta que comprende el compuesto activo 2,5-diformilfuran se puede utilizar ya sea en una composición de alimentos o en un suplemento alimenticio. El complemento alimenticio puede ser en forma de gelatina o cápsulas blandas vegetales o cápsulas de gelatina dentro del ámbito de aplicación de la presente invención. Dicho suplemento alimenticio puede contener de 0,01 a 100 % en peso del extracto de la planta. Más preferiblemente, la cantidad de extracto de planta es de 0,02 % a 40 % en peso, y en particular de 0,2 % a 20 % en peso en relación con el peso total de la composición.

45 En el contexto de un uso alimentario, con fines nutricionales o cosméticos (cosmético-alimentario o nutricosmético), la composición se formulará ventajosamente en forma de una preparación adaptada a la administración oral. No puede comprender ningún excipiente y puede consistir, en su totalidad, en el extracto de la planta que comprende el compuesto activo 2,5-diformilfuran.

50 Según una realización preferente, las composiciones según la invención están destinadas más particularmente a la administración tópica. Por lo tanto, estas composiciones deben contener un medio estéticamente aceptable, es decir, compatible con la piel y las faneras, y cubrir todas las formas cosméticas. Estas composiciones pueden ser en particular en forma de cremas, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite o emulsiones múltiples, sueros, soluciones, suspensiones, geles, etc. leches, lociones, barritas o incluso polvos, y adaptados para su

aplicación en la piel, labios y/o faneras. Estas composiciones comprenden los excipientes necesarios para su formulación, tales como disolventes, emolientes, espesantes, diluyentes, tensioactivos, antioxidantes, agentes bioactivos, colorantes, conservantes, perfumes. Se pueden utilizar como un producto de cuidado y/o como un producto de maquillaje para la piel.

- 5 La composición de acuerdo con la invención puede consistir en particular en una composición para el cuidado del cabello, y en particular un champú, un acondicionador, una loción de tratamiento, una crema o gel de peinado, una loción de reestructuración para el cabello, una máscara, etc. La composición cosmética de acuerdo con la invención puede utilizarse en particular en tratamientos que utilizan una aplicación que puede o no ir seguida de enjuague, o alternativamente en forma de champú. La composición según la invención puede ser utilizada ventajosamente en el
- 10 cuidado de la anticaspa. También puede ser en forma de tinte o rímel para ser aplicado con un cepillo o un peine, en particular a las pestañas, las cejas o el cabello.

Las composiciones según la invención comprenden, además, cualquier aditivo comúnmente utilizado en el campo de aplicación previsto, así como los adyuvantes necesarios para su formulación, tales como disolventes, espesantes, diluyentes, antioxidantes, colorantes, etc. protectores solares, autobronceadores, pigmentos, rellenos, conservantes,

15 perfumes, absorbentes de olores, principios activos cosméticos o farmacéuticos, aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos esenciales, surfactantes, polímeros formadores de película, etc.

Diccionario y Manual del INCI («International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (13ª ed. 2010) Publicado por "The Personal Care Products Council, Inc.", Washington, D.C.) describe una amplia variedad, sin limitación, de ingredientes cosméticos y farmacéuticos generalmente utilizados en la industria del cuidado de la piel, que son

20 adecuados para su uso como ingredientes adicionales en las composiciones de acuerdo con la presente invención.

En todos los casos, una persona experta en el arte se ocupará de que estos adyuvantes y sus proporciones sean elegidos para no perjudicar las propiedades ventajosas deseadas de la composición según la invención.

De acuerdo con una realización ventajosa de la invención, la cantidad o contenido de extracto de planta en la composición de acuerdo con la invención es de 0,002 a 20 % en peso, y en particular de 0,001 a 10 % en peso con

25 respecto al peso total de la composición.

Finalmente, el cuarto objeto de la invención es el uso cosmético o nutricosmético de una composición según la invención para mejorar la apariencia de la piel, las mucosas y las faneras, para relajar, calmar y desestresar la piel y prevenir y/o combatir los signos de la piel del envejecimiento y/o fotoenvejecimiento y prevenir las manchas de la edad.

- 30 Según una realización, el propósito del uso según la invención es más particularmente relajar, calmar y desestresar la piel y combatir los signos del envejecimiento de la piel.

Según otra realización, el propósito del uso según la invención es evitar la aparición de manchas de edad.

Aunque la invención ha sido descrita en relación con varias realizaciones particulares, es bastante obvio que no se limita en modo alguno a la misma y que comprende todos los equivalentes técnicos de los medios descritos, así

35 como sus combinaciones, si estos caen dentro del alcance de la invención.

El uso del verbo "contener", "comprender" o "incluir" y sus formas conjugadas no excluye la presencia de elementos o etapas distintos de los establecidos en una reivindicación.

En las reivindicaciones, cualquier signo de referencia entre paréntesis no puede interpretarse como una limitación de la reivindicación.

40 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un extracto vegetal a partir de la torta de *Moringa peregrina*

Semillas no descascarilladas cosechadas a la madurez del fruto de *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori se secaron para obtener un contenido de humedad interna inferior al 8 % y preferiblemente alrededor del 6 %, luego se presionaron con una prensa de tornillo mecánica, para separar el aceite del resto de la semilla para obtener, por un

45 lado, aceite virgen y, por otro, una torta. La torta se aísla en forma de filamentos precortados en trozos de 1 a 2 cm. A partir de la torta precalentada durante 10 min a 55° C, la maceración y extracción se lleva a cabo con etanol a 96° precalentado durante 10 min a 55° C en la proporción 25/75 % (m/m), La mezcla se cizalla en un mezclador durante 15 min y luego se revuelve en una hélice durante 2 h a una temperatura de entre 16° C y 30° C. La mezcla se filtra con Büchner al vacío y se obtiene un filtrado amarillo pálido que contiene 1,15 % de materia seca. El extracto líquido

50 obtenido se denomina en lo sucesivo "extracto de *peregrina* según la invención" o "extracto de *peregrina*" o "extracto de torta de *peregrina*". Este extracto líquido se utiliza posteriormente en las diversos ensayos de eficacia.

Este extracto de *peregrina* según la invención contiene el 1,15 % de la materia seca que comprende (resultados expresados con respecto a la materia seca (DM):

[Tabla 1]

Compuestos activos	Compuestos totales MS		%
	Furfural	2,528	57,18
	2,5-Furandicarboxaldehído	54,66	
Sustancias grasas de origen vegetal	Miristato de isopropilo	1,175	42,812
	Ácido palmítico	4,713	
	Ácido oleico	11,093	
	Triglicéridos	25,831	

El extracto seco descrito anteriormente se obtiene mediante un procedimiento gravimétrico basado en la masa antes y después de la evaporación presente en el extracto líquido.

- 5 El 2,5-Furandicarboxaldehído o 2,5-diformilfuran es el ingrediente activo de este extracto.

Se analizó por procedimiento cromatográfico, y más precisamente por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama.

El Furfural se analizó utilizando un procedimiento idéntico

El Miristato de isopropilo se analizó mediante un procedimiento idéntico

- 10 El ácido palmítico y el ácido oleico se analizaron de acuerdo con un procedimiento idéntico

Los triglicéridos fueron aislados por ultra-centrifugación.

Ejemplo 2: Efecto del extracto de *peregrina* según la invención como antioxidante

- 15 El objetivo de este estudio es evaluar la modulación de la actividad antioxidante por el extracto de *peregrina* en un modelo colorimétrico acelular *in vitro* utilizando el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y el antioxidante de referencia, ácido ascórbico. El procedimiento utilizado se llama inhibición. Se basa en la degradación del radical oxidante DPPH, de coloración violeta que absorbe a 540 nm, por un antioxidante de referencia, ácido ascórbico. Esta reacción sirve como un control positivo y conduce a la formación del compuesto DPPH, que es incoloro o incluso amarillo claro. El extracto de *peregrina* según la invención y el producto de referencia "ácido ascórbico" entran en contacto con la solución DPPH durante 30 min a 40°C. La actividad antioxidante se evalúa midiendo la
- 20 absorbancia a 540 nm. La modulación de esta actividad se expresa como un porcentaje de estimulación de la actividad antioxidante por el ingrediente activo probado, con referencia a la máxima actividad antioxidante obtenida en presencia de ácido ascórbico (T+).

- 25 Protocolo: Se incubó una solución DPPH durante 30 minutos a 40°C., en ausencia (control), en presencia del extracto de *peregrina* según la invención (T+) y en concentraciones decrecientes de la muestra a analizar. Al final del período de incubación, la actividad antioxidante en presencia del producto de referencia y en presencia o ausencia del extracto de *peregrina* se reveló por tinción después de 30 minutos a 40 ° C. Así, se evaluó midiendo la absorbancia del medio de reacción a 540 nm. Para cada concentración ensayada, la modulación de la actividad antioxidante por el producto ensayado se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula.

[Ec. 1]

$$\text{Porcentaje de modulación de la actividad antioxidante} = 100 \times [(\text{DO540 Control} - \text{DO540 Producto a ensayar}) / \text{DO540 Producto de referencia}]$$

- 30 Si el resultado es negativo, el producto de ensayo se considerará agente oxidante; si el resultado es positivo, el porcentaje se expresará como estimulación de la actividad anti-radical. Los resultados obtenidos se dan a continuación.

[Tabla 2]

		Inhibición de DPPH
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	2 %	36
	1,0 %	23
	0,1 %	5

Conclusión: el extracto de *peregrina* según la invención es capaz de proteger contra los radicales libres, tiene importantes propiedades antioxidantes desde la concentración del 1 %.

5 **Ejemplo 3: Efecto del extracto de *peregrina* según la invención como inhibidor de metalo-proteasas**

El objetivo de este estudio es evaluar la modulación de la actividad inhibitoria de las metalo-proteasas por el extracto de *peregrina* según la invención en un modelo acelular *in vitro* utilizando una colagenasa tipo I y una hialuronidasa, un complejo de sustrato y un cromóforo, ninhidrina. Una solución tamponada de colagenasa e hialuronidasa tipo I reacciona con un complejo de sustrato específico y lo transforma para formar un compuesto capaz de activar un cromóforo mediante incubación a 80 °C durante 15 min. La actividad de la colagenasa y la hialuronidasa puede evaluarse midiendo la absorbancia a 565 nm. La muestra se pone en contacto con la solución de colagenasa e hialuronidasa al mismo tiempo que el complejo de sustrato enzimático a 37 °C durante 5 minutos. El sustrato transformado por las enzimas es capaz de activar el cromóforo mediante incubación a 80 °C durante 15 minutos. La actividad de la colagenasa y la hialuronidasa en presencia/ausencia de la muestra se evalúa midiendo la absorbancia a 565 nm. La modulación de esta actividad se expresa como un porcentaje de inhibición o activación de la actividad de colagenasa e hialuronidasa en ausencia de agente activo, es decir, solo en presencia del sustrato de la enzima.

Protocolo: Una solución de enzimas de colagenasa e hialuronidasa tipo I se incuba en su sustrato durante 5 minutos en ausencia o presencia del extracto de *peregrina* según la invención ensayada. Las soluciones se ponen entonces en contacto con el cromógeno, Ninhidrina, antes de la incubación durante 15 minutos a 80 °C. Al final del período de incubación, se evaluó la actividad de las enzimas colagenasa e hialuronidasa con y sin el producto de ensayo o de referencia midiendo la absorbancia del medio de reacción a 565 nm. Para cada concentración ensayada, la modulación de la actividad de las enzimas de colagenasa e hialuronidasa por el producto de ensayo se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula.

[Ec. 2]

Porcentaje de modulación de la actividad de la enzima Colagenasa/Hialuronidasa =

$$100 \times \left[\frac{(\text{DO producto de ensayo o de referencia} - \text{DO Colagenasa/Hialuronidasa solo})}{\text{DO Colagenasa/Hialuronidasa solo}} \right]$$

Si el resultado es negativo, el porcentaje se expresa como inhibición de las enzimas; si el resultado es positivo, el porcentaje se expresa como activación de las enzimas. Los resultados de la inhibición de las metalo-proteasas por el extracto de *peregrina* según la invención se dan a continuación.

[Table3]

		Inhibición versus control (%)
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	1 %	87
	0,5 %	87
	0,1 %	88
	0,01 %	62

Conclusión: El extracto de *peregrina* según la invención genera una fuerte inhibición de las metalo-proteasas (colagenasa/hialuronidasa) del 62 % a niveles muy bajos del 0,01 %. El extracto de *peregrina* según la invención es

capaz de inhibir fuertemente estas metalo-proteasas y tiene un buen potencial para proteger con gran eficacia la matriz extracelular de la piel y, por esta inhibición, muestra un efecto antienvjecimiento.

Ejemplo 4: Efecto del extracto de *peregrina* según la invención para inhibir las enzimas histona desacetilasas (HDACs) y Sirtuina I.

- 5 El objetivo de este estudio es demostrar la actividad inhibitoria del extracto de *peregrina* de acuerdo con la invención sobre las enzimas HDACs y sirtuinas I. Una solución tamponada de HDACs y Sirtuina I reacciona con un sustrato durante 20 minutos a 37° C y lo transforma para formar un compuesto que se coloree Presencia de un revelador después de la incubación a 37 °C durante 10 minutos. La actividad de desacetilación máxima de las sirtuinas puede evaluarse midiendo la absorbancia a 405 nm. El extracto de *peregrina* según la invención o el producto de referencia
- 10 "Inhibidor de Tricostatina A (STA) Inhibidor 1µm" se pone en contacto con la solución de Sirtuinas al mismo tiempo que el sustrato de la enzima durante 20 minutos a 37° C, el sustrato transformado por la enzima se tiñe con la adición de un revelador. La actividad desacetilante de las HDACs y Sirtuina I en presencia del agente activo se evalúa midiendo la absorbancia a 405 nm. La modulación de esta actividad se expresa como un porcentaje de inhibición o activación de la actividad máxima de las HDACs y Sirtuina I en ausencia de agente activo, es decir, solo
- 15 en presencia del sustrato de las enzimas HDACs y Sirtuina I.

Protocolo: Se incubaba una solución de enzimas de Sirtuina en su sustrato durante 20 min en ausencia (control) o presencia del producto de referencia, o de concentraciones crecientes de los productos bajo ensayo. El extracto de *peregrina* según la invención se prueba en las siguientes concentraciones: 2 %; 1 %; 0,1 % (V/V). Al final del periodo de incubación, la actividad de las enzimas Sirtuina con y sin el producto de ensayo o de referencia se reveló

20 mediante tinción con una solución reveladora ((10 min a 37° C) y se evaluó mediante la medición de la absorbancia del medio de reacción a 405 nm. Para cada concentración ensayada, la modulación de la actividad desacetilante de las enzimas histona desacetilasa y Sirtuina I por el producto de ensayo se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula.

[Ec. 3]

$$\text{Porcentaje de modulación de la actividad de las enzimas Sirtuinas} = 100 \times \left\{ \left(\frac{\text{DO}_{405} \text{ producto de ensayo o de referencia}}{\text{DO}_{405} \text{ HDACs \& Sirtuinas I solas}} \right) - \left(\frac{\text{DO}_{405} \text{ HDACs \& Sirtuinas I solas}}{\text{DO}_{405} \text{ Sirtuinas solas}} \right) \right\}$$

- 25 Si el resultado es negativo, el porcentaje se expresa como inhibición de la reacción enzimática; si el resultado es positivo, el porcentaje se expresa como activación de la reacción enzimática. Los resultados de la inhibición de las enzimas histonas desacetilasas (HDACs) se dan a continuación.

[Table4]

Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	porcentaje	Inhibición versus control (%)
	2 %	20
	1 %	ns
	0,10 %	-18

- 30 Conclusión: Al 2 %, el extracto *peregrina* según la invención muestra una inhibición significativa de las HDACs; esta inhibición significa la capacidad de promover la autoprotección de las células de la piel contra la deriva genética, en particular vinculada al procedimiento de envejecimiento. Por lo tanto, el extracto parece ser útil contra uno de los derivados genéticos más comunes en la superficie de la piel, a saber, la fibrosis que se manifiesta por la aparición de "granos" de carne (protuberancia fibrótica). El extracto puede interferir ventajosamente con los fenómenos de fibrosis
- 35 en la superficie de la piel y así prevenir el envejecimiento de la piel.

Ejemplo 5: Efecto del extracto de *peregrina* según la invención para modular la actividad antiinflamatoria de la enzima fosfolipasa-A2.

- El objetivo de este estudio es evaluar la modulación de la actividad antiinflamatoria de la enzima fosfolipasa A2 por una o más muestras en un modelo acelar in vitro utilizando el "Kit de Ensayo de Detección de Inhibidores SPLA2
- 40 (tipo V)". La fosfolipasa A2 es una enzima clave en el procedimiento inflamatorio iniciado por la cascada araquidónica. Una solución tamponada de fosfolipasa A2 reacciona con un sustrato específico, diheptanoil thio-pc, y lo transforma para formar un compuesto que se une a un cromógeno, DTNB con agitación a temperatura ambiente. La actividad de la fosfolipasa A2 se puede evaluar midiendo la absorbancia a 413 nm. El extracto de *peregrina* según la invención o el producto de referencia inhibidor "Tioeteramida-PC" se pone en contacto con la solución de

fosfolipasa A2 al mismo tiempo que el sustrato de la enzima. El sustrato transformado por la enzima se tiñe con el cromógeno DTNB agitando a temperatura ambiente. La actividad del extracto de *peregrina* según la invención o del producto de referencia se evalúa midiendo la absorbancia a 413 nm. La modulación de esta actividad se expresa como un porcentaje de inhibición o activación de la actividad de la fosfolipasa A2 en ausencia de agente activo, es decir, solo en presencia del sustrato de la enzima (diheptanoil thio-pc).

Protocolo: Se incuba una solución de enzima fosfolipasa A2 en su sustrato, diheptanoil thio-PC, en ausencia o presencia del inhibidor de referencia y del extracto de *peregrina* según la invención, testado a las siguientes concentraciones: 2 %; 1 %; 0,1 % (V/V), luego el cromógeno DTNB se incorpora antes de la incubación durante 15 minutos a 25 °C. Al final del período de incubación, la actividad de la enzima fosfolipasa A2 con y sin el producto de ensayo o de referencia se evalúa midiendo la absorbancia del medio de reacción a 413 nm. Para cada concentración ensayada, la modulación de la actividad de la enzima fosfolipasa A2 por el producto de ensayo se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula.

[Ec. 4]

$$\text{Porcentaje de modulación de la actividad de la enzima Fosfolipasa A2} = 100 \times [(\text{DO}_{405} \text{ producto de ensayo o de referencia} - \text{DO}_{405} \text{ sPLA2 sola}) / \text{DO}_{405} \text{ sPLA2 sola}]$$

Si el resultado es negativo, el porcentaje se expresa como inhibición de la enzima; si el resultado es positivo, el porcentaje se expresa como activación de la enzima. Los resultados de la modulación de la actividad antiinflamatoria de la enzima fosfolipasa-A2 se dan a continuación.

[Tabla 5]

		inhibición versus control (%)
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	2 %	19
	1 %	16
	0,10 %	11

Conclusión: El extracto de *peregrina* según la invención genera una ligera inhibición estable de PLA2 a partir de la dosis del 0,1 % pero más preferiblemente al 1 o 2 %. Esto significa que el extracto de *peregrina* según la invención tiene la capacidad de reducir la cascada araquidónica / cascada de inflamación muy aguas arriba; este extracto tiene un buen potencial calmante o relajante en la piel.

Ejemplo 6: Efecto del extracto de *peregrina* según la invención para inhibir la acción de la endotelina 1

La endotelina es el vasoconstrictor más potente conocido en el cuerpo humano. Por otro lado, la disminución de endotelina también es conocida por crear un efecto vasodilatador [HIRATA Y. et al., 1988, mecanismo celular de acción por una nueva endotelina vasoconstrictora en células de músculo liso vascular de rata cultivadas, Biochemical and Biophysical Research Communication 154: 3, p. 868-875,] [SHALINKUMAR P. et al., 2018, H2S Mediates the Vasodilator Effect of Endothelin-1 in the Cerebral Circulation. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 315, p. 1759-1764].

El objetivo es el ensayo de endotelina tipo 1 en células endoteliales microvasculares humanas después de la exposición durante 24 h al extracto de *peregrina* según la invención.

Protocolo: Las células endoteliales microvasculares humanas fueron suministradas por la empresa PELOBiotech y cultivadas en placas de 96 pocillos según los procedimientos de producción del proveedor. Los extractos pueden actuar a diferentes concentraciones en las células endoteliales a una confluencia del 80 % durante 24 horas, luego la endotelina 1 se cuantifica utilizando el kit PicoKine ELISA (EDN1) en los sobrenadantes celulares. Se realiza previamente un ensayo de viabilidad para definir las dosis no tóxicas que se utilizarán durante la determinación de endotelina 1. El control negativo se lleva a cabo utilizando las células en medio de cultivo sin tratamiento. El control positivo en el ensayo de viabilidad es 0,5 % SDS. Todas las condiciones se preparan en medios de cultivo, y las células se incuban a 36,5° C/ 5 % CO₂ durante 24 horas.

A) Aplicación de soluciones de ensayo a células endoteliales:

Los productos que se van a probar entran en contacto con las células endoteliales en subconfluencia en las placas de 96 pocillos. Para cada concentración, el ensayo se lleva a cabo en 3 pocillos. Las placas se incuban durante 24 horas ± 1 hora a 36,5 °C/ 5 % CO₂.

b) ensayo de viabilidad:

La viabilidad celular se evalúa mediante el procedimiento MTT en las células después de la incubación con los productos. Después de la incubación durante 24 horas, los sobrenadantes se recuperan y almacenan a -20°C para los ensayos. A continuación, los pocillos se enjuagan una vez con 200 μL de PBS. Se añaden 50 μL de solución MTT a 0,5 mg/ml a cada pocillo: Incubación durante 3 horas a $36,5^{\circ}\text{C}$ / 5 % CO_2 . Se añaden 100 μL de isopropanol a cada pocillo. Después de la homogeneización, la absorbancia se lee a 550 nm. Para cada condición, la relación de las densidades ópticas medias de las células a las densidades ópticas medias de los controles negativos determinará la tasa de viabilidad.

C) Ensayo de endotelina 1:

El ensayo se lleva a cabo utilizando el kit ELISA.

[Tabla 6]

	Concentración extracto	Crecimiento celular versus control (%)	Endotelina 1 versus control (%)	Endotelina 1 versus control (pg/ml)
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	5 %	-22,31	- 53,21	- 71,8
	1 %	0	- 11,61	-15,66
	0,10 %	-5,77	- 25,11	- 33,88

Conclusión: El ensayo de viabilidad realizada al final del tratamiento no mostró ningún efecto tóxico para las concentraciones ensayadas. La determinación de endotelina 1 se lleva a cabo en los sobrenadantes celulares a concentraciones no tóxicas. La cantidad de endotelina 1 para cada condición se analiza utilizando el kit ELISA. Para las células del control negativo, los valores son del orden de 134,94 pg/ml. Para las células tratadas con diferentes concentraciones de extractos, los valores son de 63,14 pg/ml (con el 5 % del extracto según la invención) a 101,06 pg/ml (con el 0,1 % del extracto según la invención), esto muestra inhibiciones muy significativas del 0,1 % del extracto según la invención con aproximadamente un 25 % de inhibición de la producción de endotelina tipo 1 y hasta un 53 % de inhibición con un 5 % del extracto según la invención.

Ejemplo 7: Efecto del extracto de *peregrina* según la invención para estimular la actividad de la telomerasa

Los telómeros son complejos protectores de ADN ubicados al final de los cromosomas lineales que promueven la estabilidad cromosómica. La brevedad de los telómeros en los seres humanos se está convirtiendo en un marcador pronóstico del riesgo y la progresión de la enfermedad, y la mortalidad prematura en muchos tipos de cáncer, incluyendo mama, próstata, colon, vejiga, cabeza y cuello, pulmón y células renales [ORNISH D., 2008, Increased Telomerase Activity and Comprehensive Lifestyle Changes: a Pilot Study, Lancet Oncology 9, p. 1048-1057]. El acortamiento de los telómeros es contrarrestado por la enzima celular telomerasa.

El objetivo del estudio es evaluar el efecto del compuesto denominado "extracto de *peregrina* según la invención" sobre la actividad de la telomerasa en un modelo compuesto por queratinocitos humanos adultos con un bajo nivel de paso en cultivo monocapa.

Protocolo: Se obtuvieron queratinocitos humanos de un donante de 49 años. Para realizar los experimentos, se utilizaron queratinocitos a un nivel de paso bajo (es decir paso nº 2 de aislamiento de células). Las células fueron cultivadas en monocapa hasta que alcanzaron la confluencia del 75 % antes de ser utilizadas en el experimento.

Producto de referencia: Se utilizó FK228 a 100 ng/ml como inductor de referencia de la actividad telomerasa1.

Protocolo de incubación: Las células se incubaron durante 24 horas en ausencia (control) o en presencia de producto de referencia o concentraciones crecientes de compuestos de ensayo como el extracto de *peregrina* según la invención en: 0,5; 1 y 5 % (v/v).

El extracto de *peregrina* según la invención se diluye directamente en el medio de incubación para alcanzar las diferentes concentraciones descritas anteriormente.

Evaluación de los efectos:

- Medición de las proteínas

Al final del período de incubación, las proteínas totales de las células se extrajeron de las células y se midieron mediante un procedimiento espectrofotométrico (procedimiento Bradford). Esta medición permite determinar el volumen exacto de extracto que se utilizará durante la medición de la actividad de la telomerasa, con el fin de mantener la misma cantidad de proteínas (que contienen telomerasa) para todas las condiciones probadas a nivel de la etapa de PCR.

- Medición de la actividad de la telomerasa

Al final del período de incubación, se extrajo la telomerasa de las células y se determinó su actividad mediante un kit específico y sensible. El principio del kit de telomerasa es medir la actividad de la telomerasa acoplado a una etapa de PCR (en el que la telomerasa funciona en su actividad de elongación) con una etapa de ELISA que permite la determinación semicuantitativa de cantidades de producto de elongación de telomerasa.

- Estadísticas

Los resultados se expresan en unidades arbitrarias para el nivel de actividad de la telomerasa (media $\pm$ D.S). El nivel de significación entre el vehículo y el producto de referencia se evaluó mediante un ensayo t de Student (*: $p < 0,05$). El nivel de significancia entre el «control» y el «compuesto de ensayo» se evaluó de forma independiente para cada producto mediante un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA unidireccional) seguido de un ensayo de Holm-Sidak (*: $p < 0,05$).

El extracto de *peregrina* según la invención, probado al 0,5 % y 1 % (v/v), no moduló significativamente la actividad de la telomerasa en comparación con el «control». Ensayado al 5 % (v/v), el extracto de *peregrina* según la invención aumentó significativamente la actividad de la telomerasa en un 18,9 % ($p < 0,001$), en comparación con «control». El producto de referencia, denominado «FK228», probado a 100 ng/ml, aumentó significativamente la actividad de la telomerasa en un 28,0 % ($p < 0,01$). Este resultado era esperado y valida el experimento. Los resultados de la estimulación de la actividad de la telomerasa se dan a continuación.

[Tabla 7]

	Concentración extracto	Crecimiento celular versus control (%)	Actividad de la telomerasa versus control (%)
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	5,00 %	+5.8	+18.90
	1,00 %	aprox. - 2,2	+4.00
	0,50 %	-2,6	+2.30

Conclusión el extracto de *peregrina* según la invención, ensayado al 0,5 % y 1 % (v/v), no moduló significativamente la actividad de la telomerasa en comparación con el «control». Probado al 5 % (v/v), el extracto de *peregrina* según la invención aumentó significativamente la actividad de la telomerasa en un 18,9 % ($p < 0,001$) en comparación con «control». El extracto de acuerdo con la invención actúa directamente sobre esta vía enzimática que construye telómeros protectores en los extremos de los cromosomas y ralentiza el envejecimiento natural del material genético. El extracto de acuerdo con la invención permite producir un efecto antienvjecimiento en los cromosomas.

Los ejemplos 2 a 7 permiten demostrar que el extracto de *peregrina* según la invención tiene propiedades antienvjecimiento, antiestrés y relajantes que demuestran un perfil de buen protector de la piel.

Ejemplo 8: Efecto del extracto de *peregrina* según la invención para estimular la actividad tirosinasa

El objetivo de este estudio es evaluar la actividad sobre la enzima tirosinasa del extracto de *peregrina* según la invención en un modelo acelular *in vitro* utilizando una enzima tirosinasa de origen fúngico (Sigma Aldrich ref. T3824), a su sustrato de L-tirosina (Sigma Aldrich ref. T3754) y un inhibidor de referencia hidroquinona (Sigma Aldrich ref. H17902, inhibidor=2,5 mM de hidroquinona). Una solución de tirosinasa tamponada reacciona con un sustrato de tirosina de 2,5 mM de L durante 60 minutos a 23 °C y lo transforma para formar un compuesto coloreado. La actividad máxima de la tirosinasa se puede evaluar midiendo la absorbancia a 475 nm. El extracto de *peregrina* según la invención o el producto de referencia «Hidroquinona» se pone en contacto con la solución de Tirosinasa al mismo tiempo que el sustrato de la enzima durante 60 minutos a 23 °C el sustrato transformado por la enzima es de color natural. La actividad de la tirosinasa en presencia del agente activo se evalúa midiendo la absorbancia a 475 nm. La modulación de esta actividad se expresa como un porcentaje de inhibición o activación de la actividad máxima de la tirosinasa en ausencia de agente activo, es decir, solo en presencia del sustrato de la enzima (L tirosina).

Protocolo: Se incubó una solución de enzima tirosinasa en su sustrato L tirosina durante 60 minutos en ausencia (control) o presencia del producto de referencia, o de concentraciones crecientes del extracto de *peregrina* según la invención/concentraciones; 2 %; 1 %; 0,1 % (V/V). Al final del período de incubación, se evaluó la actividad de la enzima tirosinasa con y sin el producto de ensayo o de referencia midiendo la absorbancia del medio de reacción a 475 nm. Para cada concentración ensayada, la modulación de la actividad de la enzima tirosinasa por el producto de ensayo se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

[Ec. 5]

$$\text{Porcentaje de modulación de la actividad de la enzima Tirosinasa} = 100 \times \left[\frac{(\text{DO475 producto de ensayo o de referencia}) - (\text{DO475 Tirosinasa sola})}{\text{DO475 Tirosinasa sola}} \right]$$

Si el resultado es negativo, el porcentaje se expresa como inhibición de la enzima; si el resultado es positivo, el porcentaje se expresa como activación de la enzima. Los resultados de la estimulación sobre la actividad de la tirosinasa se dan a continuación.

[Tabla 8]

		Activación versus control (%)
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	2 %	65
	1 %	37
	0,10 %	8

Conclusión: El extracto de *peregrina* según la invención es capaz de disminuir el nivel de actividad basal de la tirosinasa, lo que hace posible indicar que este extracto tiene la capacidad de aumentar una de las protecciones naturales de la piel, la protección contra los rayos ultravioleta.

Ejemplo 9: Efecto del extracto de *peregrina* según la invención para inhibir la producción de melanina

El objetivo de este estudio sobre cultivos celulares humanos es agrupar todos los datos utilizados, así como los resultados obtenidos, para la realización del ensayo de modulación de melanina en melanocitos humanos después de la exposición durante 5 días al extracto de *peregrina* según la invención.

Protocolo: Los melanocitos humanos se cultivan en las placas de 96 y 24 pocillos.

Se trata de permitir que el extracto peregrina según la invención actúe a concentraciones de 5 %; 2 %; 1 % y 0,1 % sobre melanocitos en confluencia durante 5 días. Un pre-test de viabilidad con MTT después de 24 horas permite evaluar la citotoxicidad y elegir las concentraciones para el ensayo de modulación de melanina. Esta modulación se evalúa mediante el ensayo de la melanina en los lisados celulares después de 5 días de exposición a los extractos. El control negativo se lleva a cabo utilizando las células en medio de cultivo sin tratamiento. El control positivo para el ensayo de viabilidad es 0,5 % SDS. Para el ensayo de la modulación de la melanina, los medios con y sin α -MSH se utilizan como controles negativos.

Todas las condiciones se preparan en medios de cultivo, y las células se incuban a 36,5° C/ 5 % CO₂ durante 24 horas para el ensayo de citotoxicidad y 5 días para el ensayo de melanina.

a) Aplicación de soluciones de ensayo a melanocitos: Las concentraciones a analizar se ponen en contacto con los melanocitos confluentes en las placas 96 (ensayo de citotoxicidad) y 24 (ensayo de melanina) de los pocillos. Para cada concentración, el ensayo se lleva a cabo en 3 pocillos. Las placas se incuban durante 24 ± 1 horas y 5 días a 36,5° C/ 5 % CO₂.

b) ensayo de viabilidad: La viabilidad celular se evalúa mediante el procedimiento MTT en las células después de 24 horas de incubación con los productos. Después de la incubación durante 24 horas, los pocillos proporcionados se enjuagan una vez con 200 μ L de PBS. Se añaden 50 μ L de solución MTT a 0,5 mg/ml a cada pocillo y se lleva a cabo la incubación durante 3 horas a 36,5 °C/ 5 % CO₂. se añaden 150 μ L de isopropanol a cada pocillo. Después de la homogeneización, la absorbancia se lee a 550 nm. Para cada condición, la relación de las densidades ópticas medias de las células a las densidades ópticas medias de los controles negativos determinará la tasa de viabilidad.

Se utiliza un valor umbral de viabilidad del 70 % en comparación con el valor de control negativo para clasificar las sustancias de ensayo como citotóxicas o no citotóxicas. Se otorga una clasificación "no citotóxica" en los resultados *in vitro* para una viabilidad > 70 % y una clasificación "citotóxica" para una viabilidad ≤ 70 %.

- 5 Se demostró que la concentración del extracto al 5 % según la invención era citotóxica al 5 % en las condiciones del ensayo. Las concentraciones 2 %, 1 % y 0,1 % se utilizan para el ensayo de modulación de melanina. La cantidad de melanina presente en las células se dosifica después de la lisis celular. Los resultados sobre la inhibición de la producción de melanina se dan a continuación.

[Tabla 9]

	Concentración extracto	Crecimiento celular versus control (%)	Inhibición de la melanina versus control (%)	Contenido de melanina (µg/ml)
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	2 %	-3,41	+16,50	152
	1,0 %	+13,46	+65,90	62
	0,10 %	+13,29	+71,40	52

- 10 Conclusión: El extracto de *peregrina* según la invención inhibe la producción de melanina *in cellulo*, lo que le confiere una propiedad que protege la piel. Esta inhibición también muestra un efecto relajante sobre los melanocitos porque el nivel basal es menor que el control (ausencia de extracto según la invención en el medio de cultivo); se recuerda que la producción de melanina es una respuesta a un estrés celular. Así, el extracto de *peregrina* según la invención demuestra la capacidad de prevenir las tareas de envejecimiento.

15 **Ejemplo 10: Caracterización analítica del extracto de *peregrina* según la invención versus el extracto de *oleifera* con un procedimiento de extracción idéntico**

Sobre la base de la torta de *Moringa peregrina* y la de *Moringa oleifera*, se aplicó el procedimiento de extracción de acuerdo con la invención descrita en el Ejemplo 1. La composición comparativa de los ingredientes extraídos sobre la base de la materia seca se da a continuación.

[Tabla 10]

Compuestos	<i>Oleifera</i> (%)	<i>Peregrina</i> (%)
Ácido acético	1,431	-
1-hidroxi-2-propanona	1,962	-
Furfural	6,140	2,528
2,5-Furandicarboxaldehído (DFF)	0,823	55,660
Miristato de isopropilo	0,128	1,175
Palmitato de metilo	0,230	-
Ácido palmítico	10,356	4,713
Palmitato de etilo	0,399	-
Linoleato de metilo	0,428	-
Oleato de metilo	2,443	-
Ácido oleico	47,844	11,093

Compuestos	<i>Oleifera</i> (%)	<i>Peregrina</i> (%)
Oleato de etilo	2,675	-
Ácido esteárico	5,064	-
Bis 2-etilhexilo hexanedioato	1,688	-
metil 7-oxo-deshidroabietato	0,327	-
2-etil-hexil 1,4-tereftalato	0,655	-
Total	84,317	74,169

Parece que los dos extractos tienen un perfil molecular muy diferente. El extracto de *Moringa oleifera* contiene menos de 1 % de DFF, mientras que el extracto de *Moringa peregrina* contiene más de 50 %.

Ejemplo 11: Ensayo comparativo con *Moringa oleifera* para el ensayo *in tubo* de colagenasa

- 5 El objetivo de este estudio es evaluar la modulación de la actividad inhibitoria de las metalo-proteasas por el extracto de *peregrina* según la invención en un modelo acelular *in vitro* utilizando una colagenasa tipo I y una hialuronidasa, un complejo de sustrato y un cromóforo, ninhidrina. Una solución tamponada de colagenasa e hialuronidasa tipo I reacciona con un complejo de sustrato específico y lo transforma para formar un compuesto capaz de activar un cromóforo mediante incubación a 80 °C durante 15 min. Las actividades de la colagenasa y la hialuronidasa se
- 10 pueden evaluar midiendo la absorbancia a 565 nm. La muestra se pone en contacto con la solución de colagenasa e hialuronidasa al mismo tiempo que el complejo de sustrato enzimático a 37 °C durante 5 minutos. El sustrato transformado por las enzimas es capaz de activar el cromóforo mediante incubación a 80 °C durante 15 minutos. La actividad de la colagenasa y la hialuronidasa en presencia/ausencia de la muestra se evalúa midiendo la absorbancia a 565 nm. La modulación de esta actividad se expresa como un porcentaje de inhibición o activación de
- 15 la actividad de colagenasa e hialuronidasa en ausencia de agente activo, es decir, solo en presencia del sustrato de la enzima.

Protocolo: Una solución de enzimas de colagenasa e hialuronidasa tipo I se incuba en su sustrato durante 5 minutos en ausencia o presencia del extracto de *peregrina* según la invención ensayada. Las soluciones se ponen entonces en contacto con el cromógeno, Ninhidrina, antes de la incubación durante 15 minutos a 80 °C. Al final del período de incubación, se evaluó la actividad de las enzimas colagenasa e hialuronidasa con y sin el producto de ensayo o de referencia midiendo la absorbancia del medio de reacción a 565 nm. Para cada concentración ensayada, la modulación de la actividad de las enzimas de colagenasa e hialuronidasa por el producto de ensayo se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula.

[Ec. 6]

Porcentaje de modulación de la actividad de las enzimas Colagenasa/Hialuronidasa =

$$100 \times \left[\frac{(\text{DO producto de ensayo o de referencia} - \text{DO Colagenasa/Hialuronidasa sola})}{\text{DO Colagenasa/Hialuronidasa sola}} \right]$$

- 25 Si el resultado es negativo, el porcentaje se expresa como inhibición de las enzimas; si el resultado es positivo, el porcentaje se expresa como activación de las enzimas. El resultado de la inhibición de las metalo-proteasas se da a continuación.

[Tabla 11]

		Inhibición versus control (%)
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	1 %	87
	0,5 %	87
	0,1 %	88

		Inhibición versus control (%)
	0,01 %	62

Conclusión: El extracto de *peregrina* según la invención genera una fuerte inhibición de las metalo-proteasas (colagenasa/hialuronidasa). Es capaz de inhibir al 88 % estas metalo-proteasas a partir de la concentración del 0,1 % y tiene un buen potencial para proteger con gran eficacia la matriz extracelular de la piel y, por esta inhibición, muestra un efecto antienvjecimiento.

A comparar con el extracto de acuerdo con la patente FR2946879 de Pierre Fabre, cuyos resultados se dan de acuerdo con el mismo ensayo.

[Tabla 12]

		Inhibición versus control (%)
Extracto de <i>Moringa oleifera</i> según la patente de Pierre Fabre	1 %	Concentración no compatible con el sistema de ensayo
	0,5 %	4
	0,1 %	24
	0,01 %	42

- 10 Conclusión El extracto según la patente de Pierre Fabre muestra una ligera acción inhibitoria sobre la actividad de la colagenasa en dependencia de dosis inversa con un pico de inhibición del 42 % para todas las concentraciones combinadas contra un pico de inhibición del 100 % para el extracto de *peregrina* según la invención.

La actividad antienvjecimiento sobre este parámetro parece ser diferente y novedosa en comparación con los efectos observados con el extracto según la patente de Pierre Fabre.

15 **Ejemplo 12: Ensayos comparativos para la actividad anti-estrés (por inhibición de PLA2).**

Para la actividad anti-estrés por inhibición de PLA2 en la piel que proporciona una orientación calmante / anti-estrés con efecto anti-enejecimiento, se realizaron dos ensayos adicionales de PLA2 *in-tubo*; una con el procedimiento de acuerdo con la invención realizada en la torta de oleifera (Extracto hecho de forma idéntica al de *peregrina* en el procedimiento según la invención), uno con el extracto correspondiente al documentoFR2946879 de Pierre Fabre, Otra corresponde a la patenteFR3076460 de BASF Beauty Care Solutionscon con el producto Purisoft® y, finalmente, una última con el documento FR2825267 de Chuun & Thurot.

El objetivo de este estudio es evaluar la modulación de la actividad antiinflamatoria de la enzima fosfolipasa A2 por una o más muestras en un modelo acelular *in vitro* utilizando el kit de análisis "SPLA2 (tipo V) Inhibitor Screening Assay Kit".

- 25 Una solución tamponada de fosfolipasa A2 reacciona con un sustrato específico, diheptanoil thio-pc, y lo transforma para formar un compuesto que se une a un cromógeno, DTNB con agitación a temperatura ambiente. La actividad de la fosfolipasa A2 se puede evaluar midiendo la absorbancia a 413 nm.

- Los productos «extracto de *peregrina* según la invención» o el producto inhibidor de referencia «Tioeteramida-PC» entran en contacto con la solución de fosfolipasa A2 al mismo tiempo que el sustrato enzimático. El sustrato transformado por la enzima se tñe con el cromógeno DTNB agitando a temperatura ambiente. La actividad de la fosfolipasa A2 en presencia/ausencia del producto "extracto de *peregrina* según la invención" o del producto de referencia se evalúa midiendo la absorbancia a 413 nm.

- La modulación de esta actividad se expresa como un porcentaje de inhibición o activación de la actividad de la fosfolipasa A2 en ausencia de agente activo, es decir, solo en presencia del sustrato de la enzima (diheptanoil thio-PC).

El inhibidor "Tioeteramida-PC" a la concentración de 1 mg en 100µl es el producto de referencia (control activo) en este estudio, este último inhibe la actividad de PLA2 en un 93 %, lo que valida el ensayo.

Se incubaba una solución de enzima fosfolipasa A2 en su sustrato, diheptanoil thio-PC, en ausencia o presencia del inhibidor de referencia y del producto "extracto de *peregrina* según la invención" probado y luego se incorpora el cromógeno DTNB antes de la incubación durante 15 minutos a 25° C.

- 5 Al final del período de incubación, se evaluó la actividad de la enzima fosfolipasa A2 con y sin el producto de ensayo o de referencia midiendo la absorbancia del medio de reacción a 413 nm. Para cada concentración ensayada, la modulación de la actividad de la fosfolipasa A2 por el producto de ensayo se calcula de la siguiente manera:

[Ec. 7]

$$\text{Porcentaje de modulación de la actividad de la enzima Fosfolipasa A2} = 100 \times \frac{[(\text{DO405 producto de ensayo o de referencia} - \text{DO405 sPLA2 sola}) / \text{DO405 sPLA2 sola}]}$$

Si el resultado es negativo, el porcentaje se expresa como inhibición de la enzima; si el resultado es positivo, el porcentaje se expresa como activación de la enzima.

- 10 [Tabla 13]

Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	1 %	19
	0,1 %	16
	0,01 %	11

- 15 La constancia y la actividad sustancialmente dosis-dependiente de este extracto de *peregrina* según la invención de la inhibición de PLA2 resaltan una actividad calmante por reducción de la intensidad aguas arriba de la cascada araquidónica. Tal acción calmante muy arriba de la cascada araquidónica reduce el impacto del estrés fisiológico basal. El extracto de *peregrina* según la invención es, en consecuencia, un agente anti-estrés.

Con el extracto del protocolo derivado de la patente FR2946879 de Pierre Fabre, se obtienen los siguientes resultados.

[Tabla 14]

Extracto de Pierre Fabre	1 %	0
	0,1 %	16
	0,01 %	8

- 20 Al 1 %, que corresponde a su dosis mínima de uso, el extracto no muestra actividad. En la dilución, aparece una actividad, pero la falta de efecto dependiente de la dosis no permite validar una acción específica y fiable del extracto sobre la inhibición de esta enzima.

Con el extracto de protocolo derivado de la patente FR3076460 de BASF Beauty Care Solutions con el producto Purisoft® LS9726, se obtienen los siguientes resultados.

- 25 [Tabla 15]

Extracto de BASF Purisoft LS9726	1 %	10
	0,1 %	12
	0,01 %	6

Este extracto muestra una ligera acción inhibitoria que no alcanza el máximo observado al 1 % con el extracto de *peregrina* según la invención, es decir, 19 % de inhibición para el extracto según la invención contra 10 % de inhibición al 1 % para este extracto.

- 5 Con el extracto de protocolo derivado de la patente FR2825267 de Chuun & Thurot, observamos los siguientes resultados.

[Tabla 16]

Extracto de Chuun y Thurot	1 %	0
	0,1 %	0
	0,01 %	0

Este extracto no muestra ninguna acción inhibitoria sobre esta enzima.

- 10 Con el extracto de protocolo derivado del procedimiento de acuerdo con la presente invención pero aplicado a la torta de *Moringa oleifera* en lugar de la torta de *Moringa peregrina*, observamos los resultados que siguen.

[Tabla 17]

Extracto de <i>Moringa oleifera</i>	1 %	No dosificado
	0,1 %	0
	0,01 %	6

Este extracto no muestra una acción inhibitoria significativa o estable sobre esta enzima. Conclusión: Solo el extracto de *peregrina* según la invención demuestra una actividad inhibitoria significativa sobre la enzima PLA2.

- 15 **Ejemplo 13: Formulación de un producto de maquillaje**

[Tabla 18]

Ingredientes	%
Agua	QSC
Triglicérido caprílico/cáprico	19,0000
Goma Acacia senegal	7,0000
Carbón	6,0000
Glicerina	5,0000
Propanodiol	5,0000
Bentonita	3,1500
Cetearil glucósido	3,0000
Alcohol cetearílico	3,0000
Alcohol bencílico	1,0000

Ingredientes	%
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	2,0000
Goma de celulosa	0,8000
Goma xantana	0,1750
Ácido cítrico	0,1750

Ejemplo 14: Formulación de un producto de lavado

[Tabla 19]

Ingredientes	%
Agua	QSC
Sulfato sódico de coco	5,0000
Isetionato de cocoilo sódico	4,0000
Bentonita	3,7800
Triglicérido caprílico/cáprico	2,0000
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	1,0000
Gluconolactona	0,7500
Benzoato de sodio	0,5450
Perfume	0,5000
Goma xantana	0,2700
Glutamato de estearoilo sódico	0,2250
Ácido cítrico	0,2250
Gluconato de calcio	0,0050

5 **Ejemplo 15 Formulación de un producto de cuidado de la piel (crema anti-envejecimiento anti-estrés)**

[Tabla 20]

Ingrediente	%
Agua	QSC
Triglicérido caprílico/cáprico	18,0000
Bentonita	4,2000

Ingrediente	%
Alcohol cetearílico	1,5000
Extracto de <i>peregrina</i> según la invención	5,0000
Gluconolactona	0,7500
Benzoato de sodio	0,5450
Goma xantana	0,5000
Perfume	0,5000
Glutamato de estearoilo sódico	0,2500
Ácido cítrico	0,2500
Gluconato de calcio	0,0050

Ejemplo 16 Formulación oral para nutricosméticos

Un comprimido para una actividad calmante/antiestrés de 1 g incluye: 3 % de extracto seco según la invención (contiene 0,6 % de 2,5-diformilfuran en un soporte de inulina) + 47 % de carbonato cálcico que contiene 200 UI de vitamina D + 25 % de gluconato de magnesio + 22 % de inulina + 3 % de estearato de magnesio.

Ejemplo 17: Ensayos toxicológicas del extracto de *peregrina* según la invención

Preparación del extracto de *peregrina* según el ejemplo 1:

Semillas de *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, cosechados a la madurez del fruto, se secaron para obtener un contenido de humedad interna de alrededor del 6 %, luego se presionaron con una prensa mecánica de tornillo, para separar el aceite del resto de la semilla para obtener por un lado el aceite virgen y por otro una torta. La torta se aísla en forma de filamentos precortados en trozos de 1 a 2 cm. A partir de la torta, la maceración y la extracción se llevan a cabo con etanol a 96° C precalentado durante 10 min a 55° C en una proporción de 25/75 % (m/m), la mezcla se corta durante 15 min y luego se revuelve en una hélice durante 2 h a 20° C. La mezcla se filtra con Büchner al vacío y se obtiene un filtrado amarillo pálido que contiene 1,15 % de materia seca. Este filtrado se utiliza puro en los ensayos que siguen.

Determinación de la actividad mutagénica en la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* (TA 100)) -Ensayo de mutación bacteriana inversa

El ensayo se realizó en 3 fases principales:

- Se llevó a cabo un experimento preliminar para evaluar la citotoxicidad del elemento de ensayo y seleccionar el intervalo de dosis para experimentos posteriores.
- Un primer experimento de genotoxicidad (Ensayo 1), con y sin activación metabólica, con incorporación directa del sistema de ensayo y la prueba mínima de agar (o controles), sobre el rango de dosis definido por el estudio preliminar,
- Un segundo experimento (Ensayo 2), con pre-incubación del sistema de ensayo y el elemento de ensayo (o controles), con y sin activación metabólica, con niveles de dosis definidos por el líder del estudio después del análisis de los resultados del primer experimento. Este segundo experimento se llevó a cabo con el fin de confirmar o complementar los resultados del primero, especialmente cuando se obtuvieron resultados equívocos o negativos.

Las diluciones de los elementos de ensayo se prepararon en agua para su análisis.

El ensayo de citotoxicidad se realizó en la cepa TA100 de *S.typhimurium* a concentraciones de 5.000, 1.600, 500, 160 y 50 µg/placa, con y sin S9-Mix.

Los reactivos utilizados para la preparación de S9-Mix se prepararon de acuerdo con las siguientes instrucciones:

[Tabla 21]

	Concentración final
MgCl ₂ ((0,4 M) + KCl ((1,65 M)	8 mm + 33 mm
Glucosa 6 fosfato ((0,2 M)	5 mm
NADP ((0,1 M)	4 mm
Tampón fosfato para S9-Mix (pH 7,4 - 0,2 M)	0,1 M
Fracción S9	10 %
Agua	Ajuste para la concentración final

Las bacterias fueron expuestas al extracto de ensayo con y sin un sistema de activación metabólica. El sistema metabólico utilizado es una fracción post-mitocondrial reforzada por cofactor (S9). Esta fracción S9, una fracción microsomal de homogenato hepático de ratas Sprague Dawley tratadas con un inductor enzimático, se prepara de acuerdo con Maron, D. M. y Ames, B. N. (1983) y fue suministrado por MOLTOX TM. Se almacena a una temperatura inferior a -70° C. La fracción microsomal S9 se utilizó a una concentración del 10 % en S9-Mix. El protocolo aplicado fue el siguiente:

- 5
 - En 3 tubos de hemólisis, se introdujo:
 - o dosificación sin activación metabólica:
 - o 0,1 ml de las diferentes concentraciones de los elementos de ensayo,
 - o 0,5 ml de tampón de fosfato estéril 0,2 M, pH 7,4,
 - o 2 ml de agar superior S. typhimurium,
 - o 0,1 ml de inóculo bacteriano (TA100).
 - o dosificación con activación metabólica:
 - o 0,1 ml de las diferentes concentraciones de los elementos de ensayo,
 - o 2 ml de agar superior S. typhimurium,
 - o 0,1 ml de inóculo bacteriano (TA100),
 - o 0,5 ml de S9-Mix.
 - o Mezclar y verter sobre la superficie del agar inferior previamente distribuido en placas Petri.
 - o Incubar a 37 °C ± 2 ° durante 48 a 72 a horas.

Estos ensayos se realizaron para cada ensayo: Ensayo preliminar de citotoxicidad, ensayo 1 y ensayo 2. El control no tratado, los controles negativos y los controles positivos realizados durante el procedimiento de preincubación se incubaron durante 20 a 30 minutos a 37 °C ± 2 ° C antes de verter el agar superior.

El protocolo aplicado fue el siguiente:

- En 4 fracciones de 2 ml de agar superior para S. typhimurium, introducir:
 - o 0,1 0,2 ml de tampón fosfato 7,4 M, pH o ,
 - o 0,1 ml de disolvente,
 - o 0,1 ml de S9-Mix.

◦ 0,1 ml de la preparación del elemento de ensayo en la concentración más alta,

- Se utiliza una fracción de 2 ml de agar superior para *S. typhimurium* para controlar su esterilidad.
- Mezclar y verter sobre la superficie del agar inferior previamente distribuido en placas Petri.
- Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 a 72 horas.

5 • El ensayo se realiza por triplicado.

- No debe observarse ningún crecimiento bacteriano.

Para al menos 5 concentraciones del extracto a analizar, se realizó un ensayo sin activación metabólica y un ensayo con activación metabólica.

Expresión de resultados e interpretación

10 Numerosos criterios permiten determinar si un resultado es positivo, en particular un aumento en el número de revertidos correlacionado con la dosis de elemento a probar, o un aumento reproducible en el número de revertidos a una o más concentraciones, con o sin activación metabólica.

- El elemento a ensayar se considera mutagénico si, al final de las etapas de verificación, se ha obtenido una relación dosis-efecto, de manera reproducible, en una o algunas de las 5 cepas con y/o sin activación metabólica. La mutagenicidad solo se tiene en cuenta a una concentración dada cuando el número de revertidos es al menos el doble de la tasa de reversión espontánea para las cepas TA98, TA100 y TA102 ($R \geq 2$) Y triplicar la tasa de reversión espontánea para TA1535 y TA1537 ($R \geq 3$).

- El elemento de ensayo se considerará no mutagénico si, al final del ensayo 1 y el ensayo 2, el nivel de revertidos siempre ha permanecido inferior al doble de la tasa de reversión espontánea para todas las concentraciones del elemento de ensayo ensayado, para las cepas TA98, TA100 y TA102 ($R < 2$) y menos del triple de la tasa de reversión espontánea para TA1535 y TA1537 ($R < 3$), con y sin activación metabólica, siempre que se haya comprobado que la ausencia del efecto mutagénico no está relacionada con la toxicidad de las concentraciones ensayadas.

25 El estudio preliminar no mostró citotoxicidad del elemento de ensayo; por lo tanto, este rango de concentración se utilizó para el ensayo de genotoxicidad 1.

Dependiendo del resultado obtenido para el ensayo 1, se decidió utilizar el mismo rango de dilución para el ensayo 2. El análisis de los revertidos muestra que:

- No se observaron efectos citotóxicos,
- Ninguna concentración del extracto de ensayo mostró una relación R mayor o igual que al menos el doble de la tasa de reversión espontánea para TA98, TA100 y TA102 y tres veces la tasa de reversión espontánea para TA1535 y TA1537, con y sin activación metabólica,
- No se observó respuesta a la dosis bajo ningún sistema de ensayo o condiciones de ensayo.

35 A la vista de los resultados obtenidos durante este estudio, el extracto de *peregrina* según el ejemplo 1 puede considerarse que no tiene actividad mutagénica ni pro-mutagénica.

Ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU

El principio del ensayo se basa en la comparación de la citotoxicidad del extracto de *peregrina* según el ejemplo 1 en presencia y ausencia de una dosis no citotóxica de UVA, en células en cultivo. La citotoxicidad se evalúa determinando la viabilidad celular utilizando un colorante vital: Rojo neutro, 24 horas después del tratamiento con los elementos de referencia y el extracto de *M. peregrina* con o sin irradiación UVA. Las células utilizadas son fibroblastos embrionarios de ratón de la línea Balb/c 3T3 clon 31 (ATCC-CCL163). El control positivo es una solución de clorpromazina (número CAS: 69-09-0). El control negativo es un diluyente del extracto probado y de referencia (solución salina tamponada $\pm 1\%$ de disolvente). El extracto de *peregrina* se probó a concentraciones de 8 en al menos cuatro pocillos de cultivo por concentración estudiada, en presencia o ausencia de UVA. Los fibroblastos se tripsinaron y se sembraron dos placas de cultivo de 96 pocillos a una tasa de 100 μl de una suspensión celular de $2 \cdot 10^5$ células/ml (es decir, $2 \cdot 10^6$ células por pocillo) en medio de cultivo completo.

Las placas sembradas fueron incubadas en un horno durante 24 horas a 37°C , 5% CO_2 . Al final de la incubación, se verificó la semi-confluencia de la capa celular. Las diluciones se prepararon justo antes de que se depositaran en

las células. Se midió el pH de mayor concentración, entre 6,5 y 8. El medio de cultivo se retiró y cada pocillo se enjuagó suavemente previamente con 150 µl de PBS mantenido a temperatura ambiente antes de ser tratado con 100 µl de cada dilución del extracto o referencia. Las placas de cultivo se incubaron en la oscuridad durante 1 h más o menos 5 minutos a 37 °C y CO₂ al 5 %. La irradiación se llevó a cabo utilizando un radiador solar BIO SUN (Vilber Lourmat RMX3W). BIO SUN es un sistema que controla la irradiación UV mediante un microprocesador programable. El sistema realiza un seguimiento continuo de la emisión de luz UV. La radiación se detiene automáticamente cuando la energía suministrada es igual a la energía programada. La irradiación espectral del dispositivo bajo ensayo se midió en el rango de longitud de onda de 250 a 700 nm con un espectrorradiómetro calibrado. Una de las 2 placas fue irradiada con su tapa a temperatura ambiente, y la otra placa fue protegida de UVA y almacenada a temperatura ambiente durante el tiempo de la irradiación. Después de la irradiación, se aspiró el medio de tratamiento y se enjuagaron las células. Luego, sin µl de medio de cultivo completo se añadieron suavemente y las placas se incubaron durante 18 a 22 h a 37° C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, se evaluó la viabilidad celular (crecimiento, morfología, integridad de la monocapa) mediante observaciones en un microscopio de contraste de fase. Se eliminó el medio de cultivo, cada pocillo se enjuagó previamente y se mantuvo a temperatura ambiente antes de ser tratado con 100 µl de la solución de tinción. Las placas se colocaron en la incubadora durante 3 horas en las mismas condiciones. Se eliminó la solución colorante y se enjuagaron las células, luego se eliminó la solución de enjuague y se agregaron 150 µl de solución de desorción a cada pocillo. Las placas fueron agitadas hasta que los cristales fueron completamente solubilizados. Las absorbancias se midieron a 450 nm.

Validación del ensayo:

La sensibilidad de las células a los rayos UVA se monitorea aproximadamente cada 10 pasadas, evaluando su viabilidad después de la exposición a dosis crecientes de irradiación. Las células se cultivan a la densidad utilizada en el ensayo. Se irradian al día siguiente a una dosis de 2,5 y 9 J/cm² y la viabilidad celular se determina un día después mediante el ensayo NRU. Las células cumplen con los criterios de calidad si su viabilidad después de la irradiación a 5 J/cm² UVA es mayor o igual al 80 % de la viabilidad de los controles mantenidos en la oscuridad: En la dosis más alta de 9 J/cm² UVA, la viabilidad debe ser de al menos el 50 % de la de los controles mantenidos en la oscuridad.

Resultados:

El control negativo tiene una absorbancia mayor o igual que 0,4. La clorpromazina, el control positivo, tiene un IC₅₀ de entre 0,1 y 2 µg/ml en presencia de UVA y de entre 7 y 90 µg/ml en ausencia de UVA. Estos resultados se utilizan para validar el ensayo. No se puede estimar la concentración de extracto de torta de *peregrina* que da 50 % de muerte celular en presencia o ausencia de UVA. La mortalidad nunca llegó al 50 %. No se puede estimar la concentración de extracto de torta de *peregrina* que da un 50 % de viabilidad celular en presencia o ausencia de UVA. La viabilidad siempre está por encima del 50 %.

Conclusión: Bajo las condiciones experimentales seleccionadas, el extracto de torta de *peregrina* puede ser considerado como no fototóxico.

Evaluación del potencial irritante ocular mediante el estudio de la citotoxicidad *in vitro* según el procedimiento de liberación del rojo neutro en la línea celular SIRC

Este estudio *in vitro* se basa en la evaluación de la citotoxicidad del extracto de torta de *peregrina* mediante la determinación de la concentración que produce una mortalidad celular del 50 % (IC₅₀) en una monocapa celular mediante la técnica de liberación roja neutra. Las células utilizadas son fibroblastos corneales de conejo SIRC (ATCC-CCL60) libres de micoplasmas.

El extracto de *peregrina* se diluyó en solución salina fisiológica al 25 % y 50 %. Los fibroblastos fueron tripsinados y se sembraron dos placas de cultivo de 24 pocillos en una proporción de 1 ml de una suspensión celular que contenía 2·10⁵ células/ml en medio de cultivo completo. Las placas sembradas fueron incubadas en un horno durante la noche a 37° C, 5 % CO₂. Al final de la incubación, se verificó la confluencia de la capa celular. La solución de tinción se preparó a 0,5 mg/ml en medio de cultivo completo. Se eliminó el medio de cultivo y se depositaron 1 ml de la solución colorante en cada pocillo. Las placas se devolvieron a la incubadora a 37° C, 5 % CO₂ durante 3 h +/- 15 minutos. Después de este tiempo de contacto, la solución colorante se eliminó y se reemplazó con 1 ml de medio de cultivo completo por pocillo. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para estabilizar el sistema antes de entrar en contacto con el extracto o la referencia. Cada pocillo fue enjuagado con 2 ml de PBS, mantenido a temperatura ambiente, luego 500 µl de cada dilución de extracto de *peregrina* o extracto de referencia fueron depositados en contacto con la capa celular. El tiempo de contacto fue de 60 segundos ((30 segundos para el control positivo). El tratamiento se llevó a cabo bien a bien con activación del cronómetro en el momento de deposición del extracto de *peregrina* o de referencia. La placa se agitó manualmente durante todo el tratamiento. Después de 55 segundos (o 25 segundos para el control positivo), se aspiró la dilución. A 60 o 30 segundos precisos, se realizaron 5 aclarados sucesivos (5 x 2 ml de PBS mantenidos a temperatura ambiente). El sobrenadante fue aspirado después de cada enjuague y después del último enjuague los pocillos permanecieron desprovistos de medio mientras esperaban la fase de desarrollo. Después del tratamiento completo de la placa de cultivo, se depositaron 1 ml de la solución de desorción en cada pocillo. La placa se agita durante unos 15 minutos

hasta obtener una coloración homogénea. Las soluciones obtenidas para cada pocillo de cultivo se tomaron y distribuyeron en 2 pocillos de una placa de 96 pocillos, es decir, 150 µl/pocillo.

Resultados:

- 5 La concentración del extracto de *peregrina* que da 50 % de muerte celular se evaluó en >50 %. El porcentaje de muerte celular al 50 % del extracto de *peregrina* se evaluó al 17 %

Conclusión: Bajo las condiciones experimentales seleccionadas, la citotoxicidad del extracto de torta de *peregrina* puede clasificarse como citotoxicidad insignificante.

Evaluación de la compatibilidad cutánea de un extracto de *peregrina* tras una sola aplicación bajo vendaje oclusivo durante 48 horas bajo control dermatológico.

- 10 El objetivo de este estudio es evaluar el grado de compatibilidad cutánea del extracto de *peregrina* mediante un ensayo de parche, realizada en la cara antero-externa del brazo durante 48 horas; y en general evaluar la capacidad del extracto de *peregrina* para mantener la piel en buen estado. se incluyeron en el estudio 10 voluntarios varones o mujeres de 18 a 65 años, sin piel seca ni sensible y sin lesiones dermatológicas en la zona de tratamiento. La compatibilidad cutánea del extracto de *peregrina*, preparado en forma de loción con el 5 % del extracto de *peregrina* según el ejemplo 1 y el 95 % de una mezcla propanodiol/sorbitol, se evaluó 48 horas después de la aplicación inicial entre 30 a 40 minutos después de la retirada del apósito. El recuento de reacciones cutáneas (eritema y edema) se realizó de 0 a 3 según las siguientes escalas:

[Tabla 22]

Conteo	Eritema (E)	Edema (OE)
0	sin eritema	sin edema
0,5	Eritema apenas perceptible, coloración muy ligeramente rosada en parte del área de parcheo	edema palpable apenas perceptible
1	Eritema leve, tinción rosada en toda la superficie del parche	edema palpable y visible
2	Eritema moderado, coloración clara sobre toda la superficie de parcheo	edema neto con o sin pápulas o vesículas
3	Eritema grave, tinción intensa en toda la zona de parches	edema significativo que se difunde fuera del área de parcheo con o sin pápulas o vesículas

- 20 Cualquier otra reacción de la piel (burbujas, pápulas, vesículas, sequedad, descamación, rugosidad, efecto jabón...) se calificó en la siguiente escala y se informó de manera descriptiva:

- 0: ninguna reacción,
- 0,5: muy ligero
- 1: ligero

- 25
- 2: moderado
 - 3: importante.

Al final del estudio, se calculó un Índice de Irritación Media (I.I.M.) utilizando la siguiente fórmula:

[Ec. 8]

$$\text{I.I.M.} = \frac{\text{Suma de reacciones cutáneas (E + Oc + burbujas + pápulas + vesículas)}}{\text{Número de voluntarios ensayados}}$$

El I.I.M. obtenido permitió clasificar el extracto ensayado según la escala presentada en la tabla siguiente:

I.I.M. $\leq 0,20$ no irritante

$0,20 < \text{I.I.M.} \leq 0,50$ ligeramente irritante

$0,50 < \text{I.I.M.} \leq 2$ moderadamente irritante

$2 < \text{I.I.M.} \leq 3$ muy irritante

- 5 Resultados: El Índice de Irritación Promedio (I.I.M.) del extracto de torta de *peregrina* es igual a: 0.

Conclusión: El extracto de torta de *peregrina* puede considerarse no irritante después de 48 horas consecutivas de aplicación en 12 voluntarios.

Conclusión general de los ensayos:

- 10 Los resultados de los ensayos realizados anteriormente son concluyentes y demuestran para el extracto de *peregrina* según el ejemplo 1:

1. Los ensayos de irritación ocular y cutánea son negativas
2. Los ensayos de fototoxicidad son negativas
3. Los ensayos de mutagenicidad son negativas.

- 15 La seguridad del extracto de *peregrina* según la invención está demostrada e ideal para un uso cosmético tópico a gran escala sin restricción en las poblaciones objetivo.

Ejemplo 18: Evaluación mediante la medición de la pérdida insensible de agua (PIE) en la barrera cutánea y su aceptabilidad después de su uso durante un periodo de 21 días

- 20 El producto estudiado en este estudio es el producto de cuidado en forma de crema del ejemplo 15. Este producto se aplica por la mañana y por la noche en la cara limpia mediante el masaje suavemente evitando el contorno de los ojos. Las mediciones se realizan en las mejillas.

Los criterios de evaluación son:

- evaluación del efecto sobre la barrera cutánea: comparación de los valores de PIE antes de cualquier aplicación del producto (D1) y luego después de 21 días de aplicación (D21).
- aumento de posibles sensaciones de incomodidad en D21.
- 25 • aceptabilidad cosmética: cuestionario cumplimentado por el voluntario en D21. se probaron 22 voluntarias de 50 años de media (entre 20 y 70 años) con todos los tipos de piel. El producto evaluado en la barrera cutánea arrojó los siguientes resultados (*=% de variación D21 con respecto a D1, **=ensayo de Wilcoxon para los datos emparejados con S=significativo ($p \leq 0,05$) y NS=no significativo ($p > 0,05$)):

[Tabla 23]

	Valor de PIE (g/m ² .h)	
	J1	J21
Media	11,70	11,79
Desviación estándar	3,26	2,87
Mediana	10,39	11,40
Mínimo	7,97	7,12
Máximo	17,30	17,14
% de variación*	-	0,83
Valor p** Significancia	-	p=0,555 (NS)

5 El análisis de los resultados muestra que la PIE se mantuvo estable en D21 en comparación con D1: el producto exhibió un efecto dermo-protector después de 21 días de aplicación. En vista de la ausencia de una disminución significativa en los valores de la PIE en D21 en comparación con D1, el efecto «nutritivo» del producto ensayado no pudo demostrarse mediante mediciones instrumentales. El 81 % de los voluntarios respondió positivamente a la pregunta “La piel está nutrida” en el cuestionario de aceptabilidad del día 21.

Conclusión: Bajo las condiciones del estudio, la crema exhibió un efecto “dermo-protector”, demostrado por la medición de la PIE y una buena aceptabilidad cosmética, con 86 % de opiniones favorables.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de semillas de *Moringa peregrina*, **caracterizado porque** se obtiene por extracción sólido-líquido de la torta de las semillas no descascarilladas, con agitación, en una proporción de aproximadamente 25 % en peso de materia sólida con respecto al peso total utilizado en un disolvente predominantemente alcohólico, siendo seleccionado el alcohol entre etanol o metanol con opcionalmente un codisolvente de tipo poliol o agua subcrítica, en una proporción del 70 al 100 % en peso de alcohol en relación con el peso total del disolvente, a una temperatura de entre 16 y 30°C durante un período de aproximadamente 2 horas y separando las fases líquida y sólida para eliminar la fase sólida y recuperar un extracto líquido de semilla de *Moringa peregrina*, siendo dicho extracto rico en el compuesto 2,5-diformilfurano.
2. Extracto según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el extracto líquido obtenido se seca con el fin de obtener un extracto seco de la torta de las semillas de *Moringa peregrina* que contiene más del 50 % en peso de 2,5-diformilfuran con respecto al peso total de la materia seca.
3. Procedimiento de obtención de un extracto de semillas de *Moringa peregrina* según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas según las cuales:
 - a) las semillas no descascarilladas de *Moringa peregrina* se recolectan y secan para obtener un contenido de humedad interna inferior al 8 %;
 - b) las semillas secas se prensan para separar el aceite del resto de la semilla para obtener la torta,
 - c) la torta obtenida en la etapa b) se tritura,
 - d) el material triturado obtenido en la etapa c) se dispersa en una proporción de aproximadamente el 25 % en peso del material sólido en relación con el peso total utilizado en un disolvente predominantemente alcohólico, siendo seleccionado el alcohol entre etanol o metanol con opcionalmente un codisolvente de tipo poliol o agua subcrítica, en una proporción del 70 al 100 % en peso de alcohol con respecto al peso total del disolvente;
 - e) se realiza una extracción sólido-líquido, con agitación, a una temperatura de entre 16 y 30 °C durante un período de aproximadamente 2 horas,
 - f) se separan las fases líquida y sólida para eliminar la fase sólida y recuperar un extracto líquido de torta de *moringa peregrina*, y
 - g) opcionalmente, cuando el alcohol es etanol, el extracto líquido de *Moringa peregrina* obtenido se seca para obtener un extracto sólido de *Moringa peregrina*.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado porque** el disolvente predominantemente alcohólico es el disolvente de etanol puro de 96°.
5. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado porque** el extracto líquido de *Moringa peregrina* obtenido es purificado por destilación, microfiltración, ultrafiltración y/o nanofiltración con el fin de concentrar el extracto en 2,5-diformilfurano con respecto a los materiales orgánicos también extraídos.
6. Composición cosmética o nutricosmética, **caracterizada porque** comprende, como agente activo, una cantidad efectiva de un extracto de semillas de *Moringa peregrina* según una de las reivindicaciones 1 a 2, y un excipiente fisiológicamente aceptable.
7. Composición según la reivindicación 6, **caracterizada porque** es una composición cosmética formulada para ser aplicada tópicamente sobre la piel y **porque** el extracto de semillas de *Moringa peregrina* está presente en la composición a una concentración de 0,002 a 20 % en peso con respecto al peso total de la composición, preferiblemente del 0,01 al 10 %.
8. Composición según la reivindicación 6, **caracterizada porque** es una composición nutricosmética formulada para ser ingerida y **porque** el extracto de semillas de *Moringa peregrina* está presente en la composición a una concentración de 0,01 a 100 % en peso respecto al peso total de la composición.
9. Uso cosmético o nutricosmético de una composición según una de las reivindicaciones 6 a 8, para mejorar la apariencia de la piel, las mucosas o las faneras, para relajar, calmar y desestresar la piel y prevenir y/o combatir los signos de la piel del envejecimiento y/o fotoenvejecimiento y prevenir las manchas de la edad.