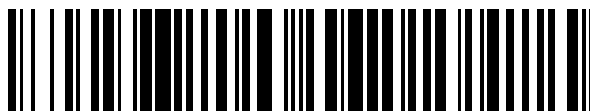


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 439**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2008 E 08783138 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2185166**

54 Título: **Procedimiento para preparar un extracto de plantas de Passiflora alata y uso de dicho extracto en composiciones cosméticas y farmacéuticas**

30 Prioridad:

03.09.2007 FR 0706151

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

04.03.2016

73 Titular/es:

**NATURA COSMÉTICOS S.A. (50.0%)
Rodovia Régis Bittencourt, Km 293
06882-700 Itapeverica da Serra-SP, BR y
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GESZTESI, JEAN-LUC;
DA LUZ MOREIRA, PATRICIA;
LORENCINI, MÁRCIO;
MANFIO, GILSON PAULO;
DELARCINA JUNIOR, SERGIO;
SOARES ESTEVES, SIMONE;
CALIXTO, JOÃO BATISTA;
FERRARI, CINTIA ROSA;
BRAZ, THIAGO;
COLLINA ROMANHOLE, RODRIGO;
PEDROSO DE OLIVEIRA, ANA PAULA;
DE OLIVEIRA, ELAINE CRISTINA y
HURTADO MEDINA, SANDRA PATRICIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 562 439 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para preparar un extracto de plantas de *Passiflora alata* y uso de dicho extracto en composiciones cosméticas y farmacéuticas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al uso de extractos de plantas de *Passiflora alata* como un ingrediente activo antiinflamatorio y analgésico en composiciones cosméticas y farmacéuticas.

Antecedentes de la invención

- 10 Las especies de plantas del género *Passiflora* (*Passifloraceae*) son nativas de las zonas tropicales y sus compuestos más importantes son los flavonoides. Estas especies de plantas son conocidas en la medicina popular debido a sus propiedades farmacológicas, tales como la acción ansiolítica e hipotensora, entre otras. Algunas especies de plantas del género *Passiflora* también se conocen como principios activos vegetales con acción antiinflamatoria. Algunos documentos de la técnica anterior relativos a la preparación de extractos de *Passiflora* y su uso en composiciones cosméticas y farmacéuticas se presentan a continuación.

- 15 El documento de patente internacional WO2005/097153 da a conocer un método específico para la preparación de extractos de la fruta de la pasión (*Passiflora*) y el uso de tales extractos como agentes protectores del hígado, antioxidantes e antiinflamatorios en mamíferos. Sin embargo, este documento no se refiere a especies particulares de *Passiflora* o a la mejora de las características de dichas especies.

El documento de patente europea EP 1 537 789 describe composiciones para la aplicación tópica que comprenden carotenoides, tocoferoles y extractos de la flor de la pasión que tienen actividad antiinflamatoria.

- 20 El documento de patente japonesa JP 200200336 describe un producto cosmético que comprende un extracto de *Cymbidium* y un extracto de plantas, tal como *Passiflora*, que inhibe la producción de melanina, y que tiene actividad antiinflamatoria.

- 25 El documento de patente japonesa JP 2000159657 describe una preparación para aplicación externa y tópica a la piel, que comprende extractos de plantas del género *Passiflora* que tienen actividad inhibidora de la producción de melanina y un efecto de blanqueamiento.

El documento de patente japonesa JP 2001122731 describe una composición cosmética que contiene extractos de *Passiflora antioquiensis* y *Passiflora mollissima* que tiene actividad de hidratación prolongada y una eficacia significativa contra las enfermedades inflamatorias.

- 30 El documento de patente japonesa JP 2002332224, a su vez, da a conocer una composición cosmética para luchar contra el envejecimiento de la piel que comprende un extracto de *Passiflora incarnata* L. que tiene actividad sobre los síntomas del envejecimiento y que comprende un ingrediente de hidratación o un ingrediente activador celular.

El documento de patente japonesa JP 7233044 describe también un producto cosmético para la prevención de arrugas con la acción de activación de las células, en el que la composición según dicho documento comprende una mezcla de extractos seleccionados de varias plantas, que incluyen *Passiflora*, *Pinelliae Tuber* y *Mori Fructus*.

- 35 El documento de patente internacional WO 2005/077328 se refiere a un producto cosmético antiarrugas a base de extractos de plantas. Los productos descritos en dicho documento son sistemas de agua en aceite que contiene un extracto de *Passiflora* y extractos de papaver, menta y mirtus con el objetivo de conseguir un efecto de humectación de larga duración y una mejor elasticidad.

- 40 El documento de patente japonesa JP 2001226219 describe una composición cosmética que contiene un extracto de planta diluido, dicho extracto de planta se selecciona del *Passiflora caerulea* L y *Passiflora edulis* Sims, mientras que el documento de patente japonesa JP 7118139 da a conocer un producto cosmético que promueve un efecto de embellecimiento de la piel que comprende un extracto de plantas, tal como *Passiflora* SSP.

- 45 El documento de patente japonesa JP 2004155664 se refiere a un agente que mejora las funciones de la piel para uso interno, dichas funciones de la piel se mejoran con el uso de un polvo vegetal de las plantas del género *Passiflora*, entre otras. El documento de patente internacional WO 2005/053435 describe preparaciones para la administración oral y/o tópica que contienen *Passiflora incarnata*, así como caroteno y tocoferoles.

- 50 Los inventores demuestran en la presente solicitud que extractos preparados a partir de plantas del género *Passiflora* tienen actividad antiinflamatoria y analgésica mejoradas, y han desarrollado un procedimiento de extracción para obtener un extracto rico en flavonoides lo que ha originado dicha actividad analgésica y antiinflamatoria mejoradas, dirigido a un uso tópico y/o interno (oral).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 contiene una breve descripción del procedimiento de extracción para obtener un extracto seco de las hojas de *Passiflora alata* enriquecido en flavonoides y, en concreto, en vitexin-2"-O-ramnósido (CAS 64820-99-1).

5 La Figura 2 presenta el perfil cromatográfico obtenido por HPLC (cromatografía líquida de alta presión) del extracto de *Passiflora alata* obtenido según la presente invención.

10 La Figura 3 presenta el perfil cromatográfico obtenido por HPLC de una fracción del extracto acuoso de *Passiflora alata* fraccionado por cromatografía preparativa, usando sílice como la fase estacionaria. Esta fracción (Fr13-23) tiene la flavona glicosilada vitexin-2-O-ramnósido como componente principal. El fraccionamiento se llevó a cabo con el fin de demostrar las actividades biológicas in vitro de este compuesto, que también está presente en el extracto acuoso original.

Las Figuras 4 a 14 representan gráficos que contienen datos relativos a las pruebas de seguridad y eficacia de muestras de extractos de *Passiflora alata* según la presente invención.

Compendio de la invención

15 La presente invención se refiere al uso de extractos de plantas de *Passiflora alata* como un agente antiinflamatorio en composiciones cosméticas y farmacéuticas.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para la obtención de un extracto de plantas de *Passiflora alata*, que comprende las etapas de:

- a) someter hojas de plantas de *Passiflora alata* a una extracción con agua para obtener un extracto acuoso;
- 20 b) someter el extracto acuoso obtenido en (a) a al menos una etapa de elución con una solución hidroalcohólica en una columna cromatográfica rellena con una resina específica de polímeros de polivinilpirrolidona o poliestireno;
- c) concentrar y secar por pulverización el extracto obtenido en (b).

Descripción detallada de la invención

25 Los presentes inventores han encontrado que los extractos de plantas de *Passiflora alata* tienen actividad antiinflamatoria y analgésica mejorada y son útiles en composiciones cosméticas, en particular composiciones antiarrugas o antienvjecimiento, así como en composiciones farmacéuticas, en particular para la administración tópica u oral.

En una forma de realización de la invención, el extracto de la planta de *Passiflora alata* se obtiene mediante un procedimiento que comprende las etapas de

- a) someter las hojas de la planta de *Passiflora alata* a una extracción con agua para obtener un extracto acuoso;
- 30 b) filtrar el extracto obtenido en (a);
- c) someter el extracto acuoso obtenido en (b) a un procedimiento de purificación por medio de una resina específica esta resina consiste en polímeros de polivinilpirrolidona o poliestireno;
- d) eluir el extracto con una mezcla hidroalcohólica acidificada;
- e) concentrar el producto obtenido en (d);
- 35 f) volver a suspender el producto obtenido en (e) en etanol caliente y después enfriar;
- g) filtrar la solución obtenida en (f);
- h) concentrar el producto obtenido en (g);
- i) secar el producto obtenido en (h) con la ayuda de un vehículo sólido.

40 Según otro aspecto de la invención, el extracto de *Passiflora alata* se obtiene mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- a) someter las hojas de la planta de *Passiflora alata* a una extracción con agua en la proporción de 1 parte de la planta a 20 partes de agua caliente, entre 60° C y 80° C, preferiblemente a 80° C, durante 2 horas;
- b) filtrar el extracto obtenido en (a);
- 45 c) someter el extracto acuoso obtenido en (b) a un procedimiento de purificación por medio de una resina específica, esta resina consiste en polímeros de polivinilpirrolidona o de poliestireno, preferiblemente poliestireno;

d) eluir el extracto resultante con una mezcla hidroalcohólica, preferiblemente con etanol al 30% en agua, acidular con ácido acético a pH 5,0;

e) concentrar el producto obtenido en (d) a 30% del material sólido total;

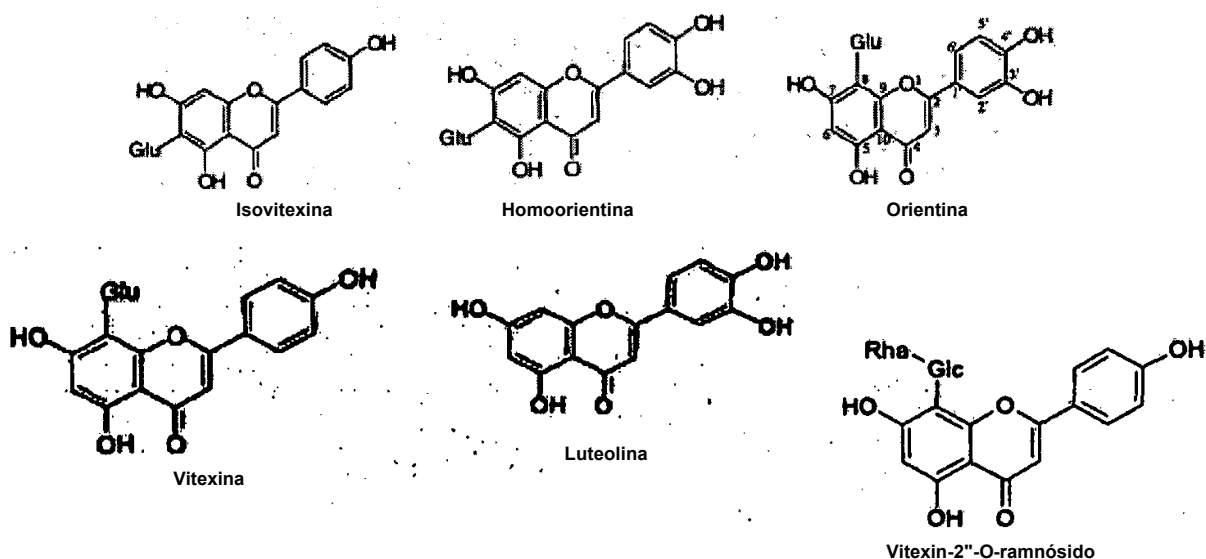
f) volver a suspender el producto obtenido en (e) en etanol caliente 96° GL a 60° C y posteriormente enfriar a 2° C;

5 g) filtrar la solución obtenida en (f);

h) concentrar el producto obtenido en (g) a 20% de material sólido total;

i) secar el producto obtenido en (h) usando un método de secado por pulverización con una temperatura de entrada de 180° C y una temperatura de salida de 85° C con la ayuda del vehículo "E 1450" (succinato de octenilo de almidón sódico) a la concentración de 1 a 8%, preferiblemente 8%.

10 El extracto seco resultante del procedimiento anterior contiene flavonoides C-glicosilados, principalmente orientina, homoorientina, vitexina, isovitexina y vitexin-2"-O-ramnósido; y flavonas, principalmente luteolina. Sus fórmulas estructurales se describen a continuación:



Se encontró que el flavonoide presente en mayor cantidad en el extracto de *Passiflora alata* obtenido según la presente invención es vitexin-2"-O-ramnósido (CAS 64820-99-1), este flavonoide solamente se encuentra en las especies de *Passiflora alata* cuando se compara con otras especies de *Passiflora* que se utilizan más comúnmente como agentes fitoterapéuticos, también se recomienda como un marcador químico para evitar adulteraciones del principio activo vegetal con otras especies de *Passiflora* (PEREIRA, 2004).

El contenido de flavonoides totales obtenidos en la presente invención está dentro del intervalo de aproximadamente 11,40% a aproximadamente 16,55%, según la metodología de dosificación de flavonoides totales, tales como vitexina, según lo determinado por la Farmacopea Portuguesa, 2000.

El contenido de vitexin-2"-O-ramnósido obtenido por la presente invención es de aproximadamente 9,70% a aproximadamente 11,90%, según la metodología de dosificación de esta sustancia por HPLC. Las condiciones de este análisis fueron:

- Cromatografía líquida de alta eficiencia Alliance con detector PDA 2996, fabricante Waters.

- Columna X-Terra RP 18,5 µm, 4,6 x 150 mm

- Fase móvil: sistema de gradiente compuesto de acetonitrilo y ácido fórmico al 0,2% v/v.

- Caudal: 0,6 ml/min

- Temperatura: 25°C

- Volumen inyectado: 20 µl

- Longitud de onda: 340,7 nm

La presente invención se refiere además a composiciones cosméticas y farmacéuticas que contienen un extracto de la planta de *Passiflora alata* como un agente antiinflamatorio activo. En las composiciones según la presente invención, la cantidad de extracto de *Passiflora alata* utilizado depende del objetivo final previsto, pero preferiblemente está entre 0,25 a 1,00% en peso, basado en el peso total de la composición. Las composiciones de la presente invención pueden contener otros ingredientes utilizados tradicionalmente en estos tipos de composiciones, tales como agentes quelantes, antioxidantes, agentes espesantes, agentes de ajuste del pH, conservantes, agentes humectantes, agentes acondicionadores, otros emolientes, agentes filmógenos, agentes de oleosidad, y agentes adsorbentes, entre otros. La presente invención se ilustrará con los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1 - Obtención de un extracto de *Passiflora alata*

Se colocaron 50 g de hojas de *Passiflora alata* en 1.000 l de agua destilada y la mezcla se calentó a 80° C durante 3 horas. A continuación, la mezcla se pasó a través de una columna de poliestireno y después se eluyó con una solución de etanol al 30% acidificada a pH 5,0 con ácido acético. El extracto resultante se filtró y se secó.

Ejemplo 2 - Obtención de un extracto de *Passiflora alata* purificado por el contacto con PVPP

Fueron sometidas 100 g de hojas secas de *Passiflora alata* a extracción con agua destilada en una proporción de 1:10 (p/v) a 80° C durante 2 horas. Después de filtración con un büchner, se tomaron 4 alícuotas de 50 ml y se mezclaron con 2,5 g de PVPP (Divergan F BASF) a 8°C.

Después de 90 minutos bajo agitación, las muestras se eluyeron en el büchner y se sometió PVPP a los siguientes eluyentes para la eliminación de los flavonoides contenidos en la mezcla resultante:

a) 50 ml de H₂O + NH₄OH 1%, 60° C, 30 minutos

b) 50 ml de H₂O + HCl 1%, 60° C, 30 minutos

c) 50 ml de EtOH + NH₄OH 1%, 60° C, 30 minutos

d) 50 ml de EtOH + HCl 1%, 60° C, 30 minutos

Las alícuotas se diluyeron 8,33 veces y luego se analizaron por HPLC en las siguientes condiciones de análisis:

Fase móvil (A): ácido fórmico 0,2% en agua

Fase móvil (B): ACN

Detección: 337 nm (para los flavonoides)

Flujo: 0,8 ml/min

Testigos: disueltos en metanol: orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, luteolina, apigenina. Concentración de 105 ppm

Columna: Phenomenex Synergil 4 micras Fusión RP-80 150 x 4,6 mm

Gradiente:

Tiempo	% (A)	% (B)
0	85	15
10	85	15
40	70	30
50	85	15

El valor del área de vitexina fue considerado para propósitos de comparación, ya que es el flavonoide principal.

La Figura 1 contiene un gráfico comparativo de los resultados obtenidos para las varias muestras, y en la Figura 2 se enumeran los cromatogramas de varias carreras realizadas en este análisis en el que se observó que PVP es capaz de absorber los flavonoides glicosilados a baja temperatura.

Ejemplo 3 - Obtención e identificación de flavonoides de diferentes extractos de *Passiflora alata*

Los flavonoides presentes en diferentes tipos de extractos de *Passiflora alata* se obtuvieron a través de 2 metodologías diferentes.

a) Ruta 1

Se suspendieron 100g de hojas secas de *Passiflora alata* en 1000 ml de agua desionizada. Seguidamente, los flavonoides fueron extraídos durante 2 horas en un matraz de reacción bajo agitación constante a 3 temperaturas diferentes: 60, 70 y 80° C.

- 5 El extracto fue filtrado en un embudo de Büchner al vacío descartando el resto de las hojas retenidas y completando el volumen del filtrado nuevamente a 1000 ml (para cada una de las diferentes temperaturas de extracción). A partir de este volumen, se dejó 500 ml de extracto a reposar durante la noche en una cámara fría a 5° C. Después de 24 horas, el extracto se centrifugó a 5° C y 4100 rpm durante 21 minutos, obteniéndose así dos fracciones: precipitado y sobrenadante. El precipitado se suspendió en etanol, se filtró en un papel de filtro común y el volumen de etanol se completó a 80 ml.

b) Ruta 2

El volumen de los otros 500 ml de extracto separados en la ruta (1) anterior se precipitó con etanol dos veces, después del enfriamiento a la temperatura ambiente anterior. A continuación, el extracto se centrifugó a 20° C y 4100 rpm durante 21 minutos, obteniéndose dos fracciones: precipitado y sobrenadante. El precipitado se suspendió en etanol, se filtró con un papel de filtro común y el volumen de etanol se completó a 80 ml.

Dosificación de la concentración de flavonoides

La concentración de los flavonoides contenidos en los extractos obtenidos por las rutas 1 y 2 se determinó según Rolim et al, 2005, y el flavonoide rutina se utilizó como estándar. La concentración se puede ver en la Figura 3, donde se expresa en µg/ml.

- 20 La Figura 3 muestra (de izquierda a derecha) el precipitado de la Ruta 1 en suspensión en etanol a 60° C (R1-60), el precipitado de la Ruta 1 a 70° C (R1-70), el precipitado de la Ruta 1 a 80° C (R1-80), el precipitado de la Ruta 2 a 60° C (R2-60), el precipitado de la Ruta 2 a 70° C (R2-70) y el precipitado de la Ruta 2 a 80° C (R2-80). Para seguir las concentraciones exactas de los extractos, los resultados de la Figura 3 también se presentan en la tabla a continuación: Tabla 1 - Absorbancias y concentraciones respectivas de flavonoides de los diferentes extractos de *P. alata*

Muestra	Absorción (391nm)	□µg/ml
R1-60	0,1908	10,10
R1-70	0,5093	26,78
R1-80	0,8166	42,87
R2-60	0,3397	17,90
R2-70	0,2791	14,73
R2-80	0,6023	31,65

A través de los datos presentados en la Figura 3, es posible seguir el perfil de concentración de los flavonoides de todos los precipitados suspendidos en etanol obtenidos a través de las rutas 1 y 2 a las tres temperaturas adoptadas en los procedimientos (60, 70 y 80° C) y se concluye que la temperatura de extracción de 80° C fue la más eficaz.

- 30 Comparando la Ruta 1 (acuosa) y 2 (con precipitación etanólica), se concluye que la Ruta 1 es más eficaz, lo que demuestra que el procedimiento se optimiza en la extracción acuosa con posterior suspensión en etanol. El precipitado suspendido de la Ruta 1 a 80° C logra una concentración superior a 40 µg/ml.

Ejemplo 4 - Evaluación de la fototoxicidad y la citotoxicidad in vitro

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto citotóxico y fototóxico de las muestras de extractos de *Passiflora alata* según la presente invención utilizando metodologías establecidas por el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América, que son internacionalmente válidas.

Definiciones:

Citotoxicidad: el ensayo permite determinar la concentración citotóxica de un componente activo, cuando las células 3T3 se incuban con él durante 24 horas. La toxicidad se determina en función de la viabilidad celular, monitorizada por la incubación de las células 3T3 con rojo neutro, un colorante vital que es incorporado por las células vivas después de 24 horas de contacto con el componente activo (Guidance Document on using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity. Publicación del NIH 01 a 4.500 (2.001)).

Fototoxicidad: La base de la prueba es comparar la toxicidad de un componente activo en presencia y ausencia de una dosis no citotóxica de radiación UVA. La fototoxicidad es medida por la captación de rojo neutro por las células que sobreviven a la incubación con el componente activo, según el protocolo de Borenfreund y Puerner(1985), que ya ha sido establecido y estandarizado por el NIH ("ZEBET/ECVAM/COLIPA Standar Operating Procedure. In vitro 3T3 Phototoxicity Test. 26 Ap, 1998 "). La fototoxicidad/fotoirritación se define como una respuesta tóxica causada después de la primera exposición de la piel a ciertos productos/componentes activos con una posterior exposición a la luz solar o que es inducida por irradiación de la piel después de la administración sistémica de un componente/producto activo ("Spielmann H, Liebsch M, Doring B, Moldenhauer F. First results of an EC/COLIPA validation project of in vitro phototoxicity testing methods. ALTEX. 1994; 11 (1):22-31").

10 **Materiales:**

Células 3T3 (línea celular de fibroblastos de ratones Balb/C de la piel del ratón).

Reactivos:

Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal (FBS), rojo neutro (Sigma-Aldrich), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, ácido acético y PBS (solución salina de tampón de fosfato).

15 **Métodos:**

Análisis de solubilidad y definición de las concentraciones del experimento: la solubilidad de las muestras se evalúa según ensayos internacionalmente estandarizados por el NIH. Con el fin de proporcionar una mejor solubilización de las muestras en soluciones acuosas, tales como DMEM (en el ensayo de citotoxicidad) o PBS (en el ensayo de fototoxicidad), se permite el uso de una concentración máxima de 1% de DMSO o etanol. Las concentraciones utilizadas en los ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad varían según los resultados de los ensayos de solubilidad de la muestra. La concentración máxima ensayada no debería ser mayor de 3 mg/ml.

20 Citotoxicidad: las células 3T3 se siembran en una placa estéril de 96 pocillos, a una densidad de 1×10^4 células/pocillo. Después de 24 horas, las células se incuban durante 24 horas con las muestras diluidas en un medio de cultivo con 5% SFB. Después, se incuban con rojo neutro durante 3 horas. El exceso de colorante se lava con PBS y los cristales formados se disuelven con etanol: ácido acético: agua (50: 1: 49). La lectura de la absorbancia se realiza a 540 nm y, a partir de los resultados obtenidos, se calcula la concentración a la que 50% de las células son viables (CI_{50}). Por lo tanto, cuanto mayor sea el valor de CI_{50} , más bajo es el potencial citotóxico de la muestra, y viceversa.

30 Fototoxicidad: las células 3T3 se siembran en una placa estéril de 96 pocillos, a una densidad de 1×10^4 células/pocillo. Se preparan dos placas idénticas pero una de ellas se irradia con rayos UVA y la otra se mantiene en la oscuridad, como control. Después de 24 horas de la siembra, las células se incuban durante 1 hora en la oscuridad con las muestras diluidas con PBS. Después de eso, una de ellas es irradiada con 5 Joules/cm² de luz UVA durante 50 minutos. Las placas se lavan con PBS y reciben un medio de cultivo con suero bovino fetal al 10% para el período de recuperación que dura aproximadamente 12 horas. En el segundo día del experimento, las células se incuban con una solución de rojo neutro durante 3 horas. El exceso de colorante se lava con PBS y los cristales formados se disuelven con etanol: ácido acético: agua (50: 1: 49). La lectura de la absorbancia se realiza a 540 nm y, a partir de los resultados obtenidos, se calcula en cada placa la concentración a la que 50% de las células son viables (CI_{50}). La relación entre los dos valores es el Factor de Fotoirritación (PIF), que clasifica la muestra como fototóxica o no.

40 **Cálculo del PIF:**

$$PIF = \frac{IC_{50} (-U)}{CI_{50} (+UV)}$$

Cuando el PIF es mayor que o igual a 5, la muestra es fototóxica.

45 Si no es posible obtener el valor de CI_{50} hasta la concentración máxima ensayada en ausencia de UV, mientras que en la presencia de UV había sido posible observar la acción fototóxica y calcular CI_{50} , >PIF se calcula dividiendo la concentración máxima ensayada por el IC_{50} de la curva de fototoxicidad con UV:

$$>PIF = \frac{C_{max} (-UV)}{CI_{50} (+UV)}$$

Cuando >PIF es mayor que 1, la muestra es fototóxica.

Ejemplo 4.1

Las siguientes muestras de extracto de *Passiflora alata* según la presente invención han sido analizadas en cuanto a la citotoxicidad:

Passiflora A = 16,54% de flavonoides; 11,02% de vitexin-2-o-r

5 Passiflora B = 11,49% de flavonoides; 0,39% de vitexin-2-o-r

En primer lugar, se preparó una solución madre de la muestra en PBS a 30 mg/ml que contenía 10% de DMSO. En el caso de la citotoxicidad, la solución madre se diluyó 10 veces en DMEM que contenía 5% de SFB, obteniéndose la concentración máxima utilizada de 3 mg/ml que contenía 1% de DMSO. Las otras diluciones ensayadas para la citotoxicidad también se habían preparado con DMEM que contenía 5% de SFB.

10 Los datos relacionados con el ensayo de citotoxicidad para las muestras descritas en la presente solicitud se han utilizado para la construcción de los gráficos de las Figuras 4 y 5.

Las muestras ensayadas y sus respectivos potenciales citotóxicos in vitro se indican en la Tabla 2. La muestra 550 fue considerada citotóxica in vitro por encima de 0,2 mg/ml.

Tabla 2: Datos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad

Muestras	Record	CI ₅₀ (mg/ml)
Extracto de Passiflora	A	NA
Extracto de Passiflora	B	2,0

15 Ejemplo 4.2

Las siguientes muestras de extracto de *Passiflora alata* según la presente invención han sido analizadas en cuanto a la fototoxicidad:

Passiflora A = 16,54% de flavonoides; 11,02% vitexin-2-o-r

Passiflora B = 11,49% de flavonoides; 0,39% vitexin-2-o-r

20 En primer lugar, se preparó una solución madre de la muestra en PBS a 30 mg/ml que contenía 10% de DMSO. En el caso de la fototoxicidad, la solución madre se diluyó 10 veces en PBS para obtener la concentración máxima utilizada de 3 mg/ml que contenía 1% de DMSO. Las otras diluciones ensayadas para la fototoxicidad también se habían preparado con PBS. Las muestras se filtraron en membranas de 0,22 µm.

25 Los datos relacionados con el ensayo de fototoxicidad para las muestras descritas en la presente solicitud se han utilizado para la construcción de los gráficos de las Figuras 6 y 7.

Las muestras ensayadas y sus respectivos potenciales fototóxicos in vitro se indican en la Tabla 3. Las muestras A y B se consideraron no fototóxicas in vitro.

Tabla 3: Datos obtenidos en el ensayo de fototoxicidad

Muestras	Record	PIF
Extracto de Passiflora	A	NA
Extracto de Passiflora	B	NA

30 Ejemplo 5 - Evaluación del potencial mutagénico mediante el ensayo de mutación inversa en *Salmonella typhimurium* (prueba de Ames)

La prueba de AMES (Maron y Ames, 1983; Directrices de la OCDE, 1997) tiene como objetivo evaluar el potencial de ciertos productos químicos para inducir mutaciones en el genoma de cepas de *Salmonella typhimurium* a través de la mutación inversa de his- a his+, con y sin un sistema de activación metabólica. En este estudio, se observó que los extractos de *Passiflora alata* no tienen potencial de actividad mutagénica en cepas de *Salmonella typhimurium*.

35 Ejemplo 5.1

Se han utilizado las siguientes muestras de extracto de *Passiflora alata* según la presente invención:

Muestra C (contenido de flavonoides totales 16,46% y contenido de vitexin-2-o-r 11,87%)

Muestra F (contenido de flavonoides totales 16,10% y contenido de vitexin-2-o-r 9,67%)

Materiales: Cepas TA97a, TA98, TA100, TA102 y TA1535 y TA1537

Reactivos: azida de sodio, 2-nitrofluoreno; 9-aminoacridina, hidroperóxido de cumeno, 2-aminoantraceno, medio mínimamente glicosilado, agar superior, fracción S9 (Molecular Toxicology Incorporated, Estados Unidos de América), agua desionizada, 4 nitroquinoleína-1-óxido, mitomicina C

Realización de la prueba

Se añadieron 0,1 ml de cultivo de bacterias cultivado durante la noche y 0,1 ml de las muestras analizadas a cada tubo que contenía 3 ml de agar superior previamente acondicionado en caldo seco a 45° C. En las pruebas con activación metabólica, se añadió 0,5 ml/placa de la fracción S9 que tiene una concentración de proteínas de 39,7 mg/ml.

Antes de la prueba, se evaluaron los genotipos de las cepas con el objetivo de garantizar las características genéticas originales de las bacterias. Por medio de medio de crecimiento selectivo, se analizó la dependencia de las cepas de histidina y biotina. Se detectó la presencia de la delección *uvrB* por la sensibilidad a la luz ultravioleta irradiada a las placas. Se detectó la mutación *rfa*, que aumenta la permeabilidad de la pared bacteriana a la entrada de las sustancias a ensayar, por medio de la sensibilidad al violeta cristal. En la prueba de la resistencia a la ampicilina, se observó la presencia de plásmido pKM101, actuando a nivel de la reparación del ADN, aumentando la mutagenicidad química y espontánea. Se verificó la presencia del plásmido pAQ1 porque imparte resistencia a la tetraciclina. Se comparó el número de colonias revertidas espontáneas por placa en cada cepa a la tasa aceptable descrita en la bibliografía por Maron y Ames (1983).

Controles positivos y negativos se han incluido en todos los ensayos. Como control negativo, se utilizó el disolvente seleccionado para la solubilización de las muestras (100 µl/placa de agua desionizada) con el fin de obtener el número de colonias revertidas espontáneas por placa para posterior comparación con el número de revertidas observado en presencia de las muestras. Como controles positivos, se utilizaron sustancias mutagénicas conocidas a fin de garantizar la capacidad de respuesta de cada cepa al mutágeno y la eficacia del sistema de activación metabólica (azida de sodio, 4-nitroquinolina-1-óxido, 9-amidoacridina, mitomicina C, 2-aminoantraceno, 2-nitrofluoreno, hidroperóxido de cumeno).

Se realizó un ensayo preliminar con la cepa TA100 para determinar el intervalo más adecuado de concentración de la muestra para la prueba definitiva utilizando concentraciones de 8; 40; 200; 1000 y 5000 µg/placa. Las concentraciones utilizadas en esta prueba no han presentado toxicidad para el crecimiento de *Salmonella typhimurion*. Por lo tanto, las concentraciones de la prueba definitiva han variado de 0,001 a 5 mg/placa. Todas las concentraciones se analizaron por triplicado en ausencia y presencia de activación metabólica. Los controles negativos y positivos se realizaron por triplicado.

Los resultados se expresaron como el número de colonias revertidas por placa y por la relación de mutagenicidad (MR), correspondiente a la relación entre el número de colonias revertidas en las placas de ensayo y el número de colonias revertidas en las placas de control negativo. El número de colonias revertidas espontáneas en cada cepa se comparó con la tasa normal aceptable que se describe en la bibliografía (Maron y Ames, 1983).

Un resultado se considera positivo cuando el promedio de colonias revertidas en las placas de prueba es mayor o igual al doble del observado en las placas de control negativo ($MR > 2$) para las cepas TA97a, TA98, TA 100 y TA 102. Para las cepas TA1535 y TA1537, MR debe ser mayor que o igual al triple.

Los controles positivos han presentado una relación de mutagenicidad de entre 5 y 152, mostrando que son adecuados y validando el experimento. No se observó ningún aumento significativo en el número de colonias revertidas en las cepas probadas después del tratamiento con las muestras C y F en cualquiera de las concentraciones probadas en presencia y ausencia de activación metabólica. Las muestras C y F mostraron una relación de mutagenicidad de menos de 2.

Ejemplo 6 - Evaluación del potencial de irritación y sensibilización de la piel in vivo

El extracto de *Passiflora alata* fue sometido a una prueba in vivo de seguridad, según Fisher, 1995:

Muestra C - (contenido de flavonoides totales 16,46% y contenido de vitexin-2-o-r 11,87%) a 25% y 50% de una solución acuosa.

El extracto se sometió a una evaluación de la irritación primaria e irritación acumulada y sensibilización a un parche. La prueba de irritación primaria se evalúa con la eliminación del parche de prueba después de 48 horas de aplicación, realizando las lecturas 30 minutos y 24 horas después de su retirada. La prueba de irritación acumulada y la prueba de sensibilización, por otro lado, requieren la aplicación de un parche de prueba en una base diaria durante un periodo de 14 días, seguido por un periodo de descanso de 14 días y la reaplicación posterior del parche

de prueba durante 48 horas, en una zona que no se había utilizado previamente para la evaluación de la irritación primaria.

El estudio fue un ensayo clínico aleatorizado, mono ciego, controlado. Cincuenta y seis voluntarios completaron el estudio y no se detectaron reacciones adversas (eritema, edema, pápulas o vesículas) en las áreas de la aplicación de la muestra.

Ejemplo 7 - Evaluación del potencial antiinflamatorio en fibroblastos humanos in vitro

El objetivo de este ensayo fue evaluar el potencial antiinflamatorio de los extractos in vitro, utilizando cultivos de fibroblastos dérmicos humanos. La significación estadística ($p < 0,05$) de los datos se verificó mediante el análisis de varianza (ANOVA de un factor) seguido de una comparación múltiple de Tukey utilizando el software SYSTAT 10.

Ejemplo 7.1

Se han utilizado las siguientes muestras de extracto de *Passiflora alata* según la presente invención:

Muestra A (contenido de flavonoides totales 16,54% y contenido de vitexin-2-o-r 11,02%)

Muestra B (contenido de flavonoides totales 11,49% y contenido de vitexin-2-o-r 0,39%)

Los fibroblastos humanos derivados de la dermis se incubaron con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* para inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 (interleuquina 6 y 8). El potencial antiinflamatorio de la muestra fue identificado por la reducción en la secreción de los marcadores pro-inflamatorios.

Materiales utilizados: dermis derivada de fibroblastos humanos, mantenida en cultivo hasta el décimo paso como máximo. Placas estériles de cultivo con 96 pocillos, placas no estériles con 96 pocillos, tubos cónicos de 15 ml y 50 ml.

Reactivos: medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal (FBS), rojo neutro, dimetilsulfóxido (DMSO), tampón de desarrollo (etanol: ácido acético: agua, 50: 1: 49), PBS (tampón de fosfato en solución salina), tampón de Lavado (PBS que contiene 0,05% de Tween-20), tampón de sensibilización (carbonato de sodio 0,1 M), tampón de bloqueo (PBS que contiene 5% de albúmina de suero bovino), lipopolisacárido bacteriano (LPS), dexametasona, hidrocortisona, kits para la dosificación de IL-6 e IL-8 por ELISA (R & D Systems), kit de desarrollo de sustrato TMB (BD Pharmingen®) y solución de parada (ácido sulfúrico 2 N).

Preparación del cultivo celular

Se prepararon placas de 96 pocillos con 2×10^4 células/pocillo en 100 μ l de DMEM que contenía 10% SFB. Las células se incubaron durante la noche en un horno de CO₂. El medio de cultivo se desechó y los pocillos se lavaron con 200 μ l de PBS.

Estimulación celular con LPS

Se añadieron 100 μ l de DMEM que contenía 1% SFB y los estímulos adecuados. La incubación se realizó en un horno de CO₂ durante la noche. Los tratamientos fueron:

- Control (sólo DMEM que contenía 1% SFB);

- LPS 10 ng/ml;

- Dexametasona 5 μ M;

- LPS 10 ng/ml + dexametasona 5 μ M;

- Extracto A 0,1 mg/ml;

- LPS 10 ng/ml + extracto A 0,1 mg/ml;

- Extracto A 1 mg/ml;

- LPS 10 ng/ml + extracto A 1 mg/ml;

- Extracto B 0,1 mg/ml;

- LPS 10 ng/ml + Extracto B 0,1 mg/ml;

- Extracto B 1 mg/ml;

- LPS 10 ng/ml + Extracto B 1 mg/ml;

Recogida de sobrenadante y análisis de la viabilidad celular

Después de la estimulación, se recogieron los sobrenadantes, se almacenaron a -20° C y se analizaron por ELISA (descrito a continuación). A fin de mantener la viabilidad celular después de la estimulación, las células se incubaron con una solución de rojo neutro durante 3 horas y después de lavar con 200 µl de PBS, se añadieron 200 µl de solución de desarrollo, y la lectura se realizó a 540 nm. En todos los tratamientos, la viabilidad celular mínima debería ser mayor que o igual a 80% de la viabilidad de control. Los datos de viabilidad celular también se utilizaron más tarde para la normalización de los datos obtenidos por ELISA.

ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)

Para el ensayo ELISA, se usaron placas de 96 pocillos. La cuantificación de marcadores proinflamatorios se determinó a partir de la comparación con las curvas estándar construidas específicamente para IL-6 o IL-8. Se utilizaron sobrenadantes de cultivo según los siguientes pasos:

- Adición del anticuerpo de captura diluido en PBS (1: 180, 100 µl/pocillo);
- Incubación durante la noche a temperatura ambiente;
- Lavado de placas 3 veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo);
- Bloqueo de los sitios libres en la placa con un tampón de bloqueo (200 µl/pocillo);
- Incubación durante 1 hora a temperatura ambiente;
- Lavado de placas 3 veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo);
- Preparación de las diluciones del patrón y muestras con el tampón de bloqueo (1:200);
- Adición de las diluciones del patrón, las muestras y el control (100 µl/pocillo);
- Incubación durante 2 horas a temperatura ambiente;
- Lavado de placas 3 veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo);
- Adición de anticuerpo de detección diluido en un tampón de bloqueo (1: 180 cada uno, 100 µl/pocillo);
- Incubación durante 2 horas a temperatura ambiente;
- Lavado de placas 3 veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo);
- Adición del conjugado de estreptoavidina-peroxidasa diluido en un tampón de bloqueo (1: 200, 100 µl/pocillo);
- Incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad;
- Lavado de placas 3 veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo);
- Adición de la solución de sustrato (100 µl/pocillo);
- Incubación de la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad;
- Adición de la solución de parada (50 µl/pocillo);
- Lectura de la absorbancia a 450 nm.

Con los resultados obtenidos, se prepararon las Tablas 2 y 3 con los valores de inhibición de la secreción de IL-6 e IL-8, respectivamente. La columna de referencia indica la muestra cuyos datos se utilizaron como base para el cálculo de los porcentajes de inhibición de las otras muestras. Los datos también se representan en los gráficos de las Figuras 8 y 9, respectivamente.

Tabla 2. Tasa de inhibición de la secreción de IL-6.

Tratamiento	% de inhibición	Referencia
Dexametasona	71	Control
Extracto A 0,1 mg/ml	15	
Extracto A 1 mg/ml	73	
Extracto B 0,1 mg/ml	19	
Extracto B 1 mg/ml	44	

Tratamiento	% de inhibición	Referencia
Dexametasona + LPS	96	LPS
Extracto A 0,1 mg/ml + LPS	68	
Extracto B 1 mg/ml + LPS	96	
Extracto B 0,1 mg/ml + LPS	69	
Extracto B 1 mg/ml + LPS	85	

Tabla 3. Tasa de inhibición de la secreción de IL-8.

Tratamiento	% de inhibición	Referencia
Dexametasona	68	Control
Extracto A 0,1 mg/ml	34	
Extracto A 1 mg/ml	85	
Extracto B 0,1 mg/ml	55	
Extracto B 1 mg/ml	67	
Dexametasona + LPS	53	LPS
Extracto A 0,1 mg/ml + LPS	24	
Extracto B 1 mg/ml + LPS	78	
Extracto B 0,1 mg/ml + LPS	32	
Extracto B 1 mg/ml + LPS	51	

Según los datos analizados, las muestras A y B indican una actividad antiinflamatoria potencial, con una reducción en la secreción de IL-6 e IL-8 en fibroblastos humanos in vitro ($p < 0,05$). Ambos extractos tienen un efecto similar a la dexametasona utilizada en el modelo. En general, los extractos utilizados en la concentración de 1 mg/ml mostraron una tasa de inhibición muy similar o mayor que la encontrada para la dexametasona a 5 μ M. Además, este efecto antiinflamatorio también se observó en la presencia de LPS, un agente conocido para inducir la respuesta inflamatoria ($p < 0,05$).

Ejemplo 7.2

Se han utilizado las siguientes muestras de extracto de *Passiflora alata* según la presente invención:

- 10 Muestra A (contenido de flavonoides totales 16,54% y contenido de vitexin-2-o-r 11,02%)

Fracción purificada de vitexin-2-O-ramnósido (Fr13-23)

Fibroblastos humanos derivados de la dermis se incubaron con lipopolisacárido (LPS) o UV para inducir la secreción de marcadores proinflamatorios IL-6 e IL-8. El potencial antiinflamatorio de la muestra fue identificado por la reducción en la secreción de los marcadores proinflamatorios.

- 15 Materiales utilizados: fibroblastos humanos derivados de la dermis, mantenidos en cultivo hasta el décimo paso como máximo. Placas estériles de cultivo con 96 pocillos, placas no estériles con 96 pocillos, tubos cónicos de 15 ml y 50 ml, cámara de irradiación con luz UVB.

Reactivos: se utilizaron los mismos reactivos indicados para el Ejemplo 7.1.

Preparación del cultivo celular

- 20 Se prepararon placas de 96 pocillos con 2×10^4 células/pocillo en 100 μ l de DMEM que contenía 10% de SFB. Las células se incubaron durante la noche en un horno de CO₂. El medio de cultivo se desechó y los pocillos se lavaron con 200 μ l de PBS.

Estimulación celular con LPS

- 25 Se añadieron 100 μ l de DMEM que contenía 1% SFB y los estímulos adecuados. La incubación se llevó a cabo en un horno de CO₂ durante la noche. Los tratamientos fueron:

- Control (sólo DMEM que contenía 1% SFB);

- LPS 10 ng/ml;
- LPS 10 ng/ml + dexametasona 5 μ M;
- LPS 10 ng/ml + Muestra A 1 mg/ml;
- LPS 10 ng/ml + Muestra A 0,5 mg/ml;
- 5 - LPS 10 ng/ml + Muestra A 0,25 mg/ml;
- LPS 10 ng/ml + Muestra A 0,125 mg/ml;
- LPS 10 ng/ml + muestra Fr13-23 1 mg/ml;
- LPS 10 ng/ml + muestra Fr13-23 0,5 mg/ml;
- LPS 10 ng/ml + muestra Fr13-23 0,25 mg/ml;
- 10 - LPS 10 ng/ml + muestra Fr13-23 0,125 mg/ml.

Estimulación celular con UVB

Se añadieron 100 μ l de PBS y los estímulos adecuados. La incubación se llevó a cabo en un horno de CO₂ durante 50 minutos. Los tratamientos fueron:

- Control (sólo PBS en células que no fueron irradiadas);
- 15 - UVB 0,23 J/cm² (sólo PBS con irradiación después de la incubación);
- UVB 0,23 J/cm² + hidrocortisona 5 μ M;
- UVB 0,23 J/cm² + Muestra A 1 mg/ml;
- UVB 0,23 J/cm² + Muestra A 0,5 mg/ml;
- UVB 0,23 J/cm² + Muestra A 0,25 mg/ml;
- 20 - UVB 0,23 J/cm² + Muestra A 0,125 mg/ml;
- UVB 0,23 J/cm² + muestra Fr13-23 1 mg/ml;
- UVB 0,23 J/cm² + muestra Fr13-23 0,5 mg/ml;
- UVB 0,23 J/cm² + muestra Fr13-23 0,25 mg/ml;
- UVB 0,23 J/cm² + muestra Fr13-23 0,125 mg/ml.
- 25 Después del período de irradiación celular (a excepción de control), los volúmenes de los pocillos fueron desechados y reemplazados con el mismo tratamiento preparado en 100 μ l de DMEM que contenía 1% de SFB y los estímulos adecuados. Después, se produjo la incubación con CO₂ durante la noche.

Recogida del sobrenadante y análisis de la viabilidad celular

- 30 Después de la estimulación, se recogieron los sobrenadantes, se almacenaron a -20° C y se evaluaron por ELISA (descrito a continuación). A fin de mantener la viabilidad celular después de la estimulación, las células se incubaron con una solución de rojo neutro durante 3 horas y, después de lavar con 200 μ l de PBS, se añadieron 200 μ l de solución de desarrollo, y la lectura se realizó a 540 nm. En todos los tratamientos, la viabilidad celular mínima debería ser mayor que o igual al 80% de la viabilidad del control. Los datos de viabilidad celular también se utilizaron más tarde para la normalización de los datos obtenidos por ELISA.

- 35 ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)

Para el ensayo de ELISA, se usaron placas de 96 pocillos. La cuantificación de los marcadores proinflamatorios se determinó a partir de la comparación con las curvas estándar construidas específicamente para IL-6 o IL-8. Se utilizaron sobrenadantes de cultivo según los siguientes pasos:

- Adición del anticuerpo de captura diluido en un tampón de sensibilización (1: 250, 100 μ l/pocillo);
- 40 - Durante la noche incubación a 4° C;
- Lavado de placas 3 veces con tampón de lavado (200 μ l/pocillo);

- Bloqueo de los sitios libres en la placa con un tampón de bloqueo (200 µl/pocillo);
- Incubación durante 1 hora a temperatura ambiente;
- Lavado de placas 3 veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo);
- Preparación de las diluciones del patrón y muestras con el tampón de bloqueo (1:200);
- 5 - Adición de las diluciones del patrón, las muestras y el control (100 µl/pocillo);
- Incubación durante 2 horas a temperatura ambiente;
- Lavado de placas 5 veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo);
- Adición de anticuerpo de detección y del conjugado de estreptoavidina-peroxidasa diluido en un tampón de bloqueo (1: 250 cada uno, 100 µl/pocillo);
- 10 - Incubación durante 1 hora a temperatura ambiente;
- Lavado de placas 7 veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo);
- Adición de la solución de sustrato (100 µl/pocillo);
- Incubación de la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad;
- Adición de la solución de parada (50 µl/pocillo);
- 15 - Lectura de la absorbancia a 450 nm.

De los resultados obtenidos, se prepararon las Tablas 4 y 5 con los valores de inhibición de la secreción de IL-6 e IL-8, respectivamente, así como los gráficos de las Figuras 10 y 11 para el estímulo con LPS, y 12 y 13 para el estímulo con UVB. La columna de referencia indica la muestra cuyos datos se utilizaron como base para el cálculo de los porcentajes de inhibición para las otras muestras.

20 Tabla 4. Tasa de inhibición de la secreción de IL-6.

Tratamiento	% de inhibición	Referencia
LPS + Dexametasona	94	LPS
LPS + Muestra A 1 mg/ml	91	
LPS + Muestra A 0,5 mg/ml	75	
LPS + Muestra A 0,25 mg/ml	62	
LPS + Muestra A 0,125 mg/ml	38	
LPS + Muestra Fr13-23 0,125 mg/ml	84	
UVB + Hidrocortisona	71	UVB
UVB + Muestra A 1 mg/ml	85	
UVB + Muestra A 0,5 mg/ml	90	
UVB + Muestra A 0,25 mg/ml	91	
UVB + Muestra A 0,125 mg/ml	84	
UVB + Muestra Fr13-23 0,125 mg/ml	80	

Tabla 5. Tasa de inhibición de la secreción de IL-8.

Tratamiento	% de inhibición	Referencia
LPS + Dexametasona	82	LPS
LPS + Muestra A 1 mg/ml	90	
LPS + Muestra A 0,5 mg/ml	71	
LPS + Muestra A 0,25 mg/ml	57	
LPS + Muestra A 0,125 mg/ml	28	
LPS + Muestra Fr13-23 0,125 mg/ml	65	

Tratamiento	% de inhibición	Referencia
UVB + Hidrocortisona	79	UVB
UVB + Muestra A 1 mg/ml	86	
UVB + Muestra A 0,5 mg/ml	88	
UVB + Muestra A 0,25 mg/ml	86	
UVB + Muestra A 0,125 mg/ml	74	
UVB + Muestra Fr13-23 0,125 mg/ml	57	

Según los datos analizados, las muestras A y Fr13-23 indican una actividad antiinflamatoria potencial, con una reducción en la secreción de IL-6 e IL-8 en fibroblastos humanos in vitro ($p < 0,05$).

La muestra A mostró actividad antiinflamatoria en los 2 modelos (estimulación con LPS y UVB), en todas las concentraciones ensayadas ($p < 0,05$).

- 5 La muestra Fr13-23 no fue citotóxica en fibroblastos humanos a la concentración de 0,125 mg/ml. Esto es probablemente debido al hecho de que esta muestra tiene una alta concentración de vitexin-2-O-ramnósido. A esta concentración y en los 2 modelos (estimulación con LPS y UVB), la muestra mostró actividad antiinflamatoria considerable.

Ejemplo 8 - Evaluación de la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 in vitro.

- 10 Se sabe que durante el procedimiento inflamatorio, la liberación de TNF- α por los macrófagos y fibroblastos tiene un papel importante en la señalización entre leucocitos y células endoteliales. La respuesta celular a la lesión comprende la adhesión de los leucocitos al endotelio de las vénulas post-capilares, seguido por la migración de las células adherentes a la parte exterior del vaso, su desplazamiento al lugar extravascular y la acumulación subsiguiente sobre la lesión, mecanismos que se han descrito como una secuencia de complejas interacciones y
- 15 señalizaciones entre leucocitos y células endoteliales. El aumento en la expresión de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1, V-CAM y E-selectina es un prerequisite para una adhesión leucocito-endotelio estable y necesariamente precede a la extravasación de leucocitos (Quinlan et al., 1999; Fuchs et al., 2001). Por lo tanto, su evaluación puede utilizarse como un modelo experimental in vitro para la evaluación pro- o anti-inflamatoria de nuevas moléculas.

20 Ejemplo 8.1

Se utilizó la siguiente muestra de extracto de *Passiflora alata* según la presente invención:

Muestra A (contenido de flavonoides totales 16,54% y contenido de vitexin-2-o-r 11,02%)

- 25 Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se incubaron con TNF- α para inducir la expresión de ICAM-1, responsable de la infiltración de células en el proceso antiinflamatorio. El potencial antiinflamatorio de la muestra se identificó por la reducción en la expresión de esta molécula.

Materiales: células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con un número total de pasajes de 6

Reactivos: medio de cultivo M199; suero bovino fetal; tripsina (Gibco). TNF- α humano (Peprotech Mexico, SA), anticuerpos anti-ICAM-1 humanos (BD Biosciences Pharmingen); solución salina tamponada con fosfato, (PBS), albúmina de suero bovino.

30 Preparación del cultivo celular

- Placas de 24 pocillos se prepararon con 5×10^4 células/pocillo en un medio de cultivo M199 y suero bovino fetal al 10%. Las células se incubaron en un horno de CO₂ durante 24 horas. Después de este período, las células se trataron con diferentes concentraciones de la muestra A con 12 horas de incubación. A continuación, las células se expusieron a 10 ng/ml de TNF- α durante un período de 6 horas para estimular la expresión de ICAM-1, este tiempo
- 35 representa el pico de la expresión de moléculas en las células endoteliales mantenidas en cultivo, como se describe por Perfetto et al. (2003) y Jiang et al. (2004). Además, la concentración de 10 ng/ml de TNF- α había sido determinada como capaz de inducir la expresión de moléculas de adhesión, sin interferir en la viabilidad celular (Piela-Smith et al., 1992).

- 40 Después de la incubación con TNF- α , las células fueron desplazadas de la placa con tripsina, se lavaron en medio de cultivo con SFB para eliminar la tripsina contenida en el medio, se centrifugaron durante 8 minutos a 300 g y se volvieron a suspender en 1 ml de paraformaldehído al 1% durante 15 minutos para su fijación. Más tarde, las células se centrifugaron de nuevo para eliminar el paraformaldehído, se volvieron a suspender en 100 μ l de PBS con 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y se incubaron con 5 μ l de anticuerpo anti-ICAM (FITC), durante una hora a la temperatura de 4° C y protegidas de la luz. Después, las células se centrifugaron durante 8 minutos a 300 g y se

volvieron a suspender en PBS para la lectura de las muestras en el citómetro de flujo FACS CALIBUR (BD), conectado a un ordenador Apple (Mackintosh) utilizando el software Cell QuestPro®. Se adquirieron diez mil (10,000) eventos. El marcado del anticuerpo isotópico se utilizó como control negativo para el anticuerpo. Los datos generados por el citómetro se analizaron con la ayuda del software, los valores se expresan como un porcentaje de las células marcadas por el anticuerpo, lo que indica el porcentaje de células que tienen expresión de ICAM-1 en la superficie, y también el promedio de la intensidad de fluorescencia de cada muestra, lo que indica cuantitativamente la expresión de moléculas de adhesión antes y después de los tratamientos con TNF- α y la muestra a las diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos con el tratamiento se expresan en los gráficos de las Figuras 14 y 15.

Sólo las células que se incubaron con la mayor concentración de muestra (316 g/ml) presentaron un incremento en la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 en relación con las células mantenidas sólo en un medio de cultivo; sin embargo, este aumento no mostró una diferencia significativa ($p > 0,05$). La incubación con TNF- α causó un aumento significativo ($p < 0,001$) en la expresión de estas moléculas de adhesión. La incubación de las células con una menor concentración de la muestra (100 $\mu\text{g/ml}$) fue capaz de inhibir el efecto de TNF- α en la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 en HUVECs parcialmente (aunque significativamente, $p < 0,001$).

Ejemplo 9 - Evaluación de la acción preventiva y curativa de la irritación de la piel in vivo

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el extracto de *Passiflora alata* incorporado en una formulación cosmética a diferentes concentraciones, en el tratamiento preventivo y curativo de la irritación de la piel causada por la aplicación de un insulto químico realizado en la región del pliegue nasolabial, utilizando la escala de dolor para la evaluación subjetiva. Se sabe que la irritación por insulto químico es transitoria, pero se caracteriza por un procedimiento micro inflamatorio con el inicio de las cascadas de señalización para el dolor y la irritación (eritema, enrojecimiento).

Ejemplo 9.1

Se utilizó la siguiente muestra de extracto de *Passiflora alata* según la presente invención:

Muestra C (contenido de flavonoides totales 16,46% y contenido de vitexin-2-o-r 11,87%)

Este extracto se incorporó en una formulación cosmética a las concentraciones de 0,25%; 0,4%; 0,75% y 1%. Las formulaciones que contenían el extracto se compararon entre sí, así como con el placebo (formulación cosmética sin el principio activo) y un control positivo (cortisona de uso dermatológico). La formulación se encuentra en la Tabla 6.

Tabla 6 - formulación cosmética

Componente	Concentración (%)
Agua desmineralizada	88,25
Acrilato de alquilo TR-1	0,20
Éter dicaprílico	2,00
Ciclometicona D5/D6 VS 7158	4,00
EDTA disódica	0,10
Lactato de cetilo	1,00
Estearato de glicerilo	0,20
Stearet-2	2,10
Stearet-21	0,70
Trietanolamina	0,10
Butilcarbamato de yodopropinilo	0,20
BHT	0,05
Fenoxietanol F	0,90
Goma de xantano	0,20

Se marcaron dos rectángulos de 1,0 x 2,0 cm, los llamados sitios, con una pluma quirúrgica en las regiones del pliegue nasolabial izquierdo y derecho de los voluntarios de entre 20 y 50 años de edad (promedio 35 años) que tenían una prueba de pinchazo positivo en la región del pliegue nasolabial. El estudio fue planeado y llevado a cabo

de acuerdo con las determinaciones de la Resolución 196/96 del Consejo Nacional de Salud, bajo las directrices y normas que regula la investigación con seres humanos. El protocolo de estudio fue aprobado el 25 de julio de 2006 por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Estatal de Campinas, en opinión escrita N° 372/2006. La significación estadística ($p < 0,05$) se comprobó mediante el análisis de varianza (ANOVA de un factor) seguido de una comparación múltiple de Tukey.

5

Usando un gotero, se aplicó una gota de solución de ácido láctico al 10% en cada sitio. Se evaluó la irritación inmediatamente después de la aplicación del ácido láctico. A continuación, se aplicaron los productos al azar. Después de 5 y 10 minutos de la aplicación, se evaluó la irritación producida. Este protocolo fue dirigido a evaluar el efecto curativo.

10 Para el efecto preventivo, se realizó la aplicación durante 3 días consecutivos dos veces al día. En el cuarto día, se aplicó el producto y después de 30 minutos se llevó a cabo el insulto químico usando una gota de solución al 10% de ácido láctico en cada sitio. Se evaluó la irritación inmediatamente después de la aplicación de ácido láctico, después de 5 minutos y después de 10 minutos.

15 Se utilizó una escala de cuantificación numérica para evaluar la irritación en función de la intensidad del dolor y la gravedad en una escala de 0 (ausencia de dolor e irritación) a 10 (intenso dolor e irritación).

Los resultados de los efectos curativo y preventivo del tratamiento se expresan en los gráficos de las figuras 16 y 17, respectivamente.

20 En el efecto curativo, todas las formulaciones cosméticas que contenían la muestra C mostraron el mismo rendimiento que el corticoide comercial de uso tópico ($p > 0,05$). La formulación de placebo fue significativamente más baja que el corticoide y todas las formulaciones que contenían el extracto de prueba ($p < 0,05$). Estos datos muestran que las formulaciones cosméticas que contienen extractos de *Passiflora alata* en cualquiera de las concentraciones ensayadas son eficaces para reducir la sensación de incomodidad (dolor, irritación y picor). Su acción no difiere significativamente de la presentada por el corticoide de uso tópico y es superior a la de la formulación placebo. Por lo tanto, los principios activos presentes en el extracto de *Passiflora alata* son responsables de la realización observada en estas formulaciones cosméticas con respecto a la reducción de la irritación y el dolor.

25

En el efecto preventivo, todas las formulaciones cosméticas que contenían la muestra C mostraron una reducción en la intensidad del dolor y la irritación. Estos efectos fueron esencialmente idénticos a los observados con el corticoide de uso tópico utilizado en el estudio. La formulación de placebo es significativamente diferente de la de corticoide ($p < 0,05$), lo que confirma que la eficacia en la prevención del dolor e irritación de las formulaciones cosméticas que contienen el extracto de *Passiflora alata* es debida a la presencia de la muestra C en la misma.

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un extracto de planta de *Passiflora alata*, caracterizado porque comprende las etapas de:
 - a) someter hojas de plantas de *Passiflora alata* a una extracción con agua para obtener un extracto acuoso;
 - 5 b) someter el extracto acuoso obtenido en (a) a al menos una elución con una solución hidroalcohólica en una columna cromatográfica rellena con una resina que consiste en polímeros de polivinilpirrolidona o poliestireno;
 - c) concentrar y secar por pulverización el extracto obtenido en (b).
2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que entre las etapas b) y c) comprende además la etapa de:
 - 10 - resuspender el producto obtenido en (b) en etanol caliente y después enfriar.
3. Una composición cosmética que comprende, como un ingrediente activo antiinflamatorio, un extracto de plantas de la especie *Passiflora alata*, dicho extracto de plantas de *Passiflora alata* es un extracto obtenido a través de un procedimiento como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. Una composición cosmética según la reivindicación 3, caracterizada por que es una composición antienvjecimiento o antiarrugas.
15
5. Una composición cosmética según la reivindicación 3 o 4, caracterizada por que el extracto de plantas de *Passiflora alata* está presente en una cantidad de 0,25% a 1,0%, en peso, basado en el peso total de la composición.
6. Una composición farmacéutica caracterizada por que comprende un extracto de plantas de la especie *Passiflora alata*, dicho extracto de plantas de *Passiflora alata* es un extracto obtenido a través de un procedimiento tal como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso como un antiinflamatorio.
20
7. Una composición farmacéutica para uso como un antiinflamatorio según la reivindicación 6, caracterizada por que el extracto de plantas de *Passiflora alata* está presente en una cantidad de 0,25% a 1,0%, en peso, basado en el peso total de la composición.
8. Una composición farmacéutica para uso como un antiinflamatorio según la reivindicación 6 o 7, caracterizada por que es una composición para uso por administración tópica.
25
9. Una composición farmacéutica para uso como un antiinflamatorio según la reivindicación 6 o 7, caracterizada por que es una composición para uso por administración oral.
10. Un extracto de la planta de *Passiflora alata* para uso como un agente antiinflamatorio en composiciones cosméticas o farmacéuticas caracterizado por que dicho extracto de plantas de *Passiflora alata* se obtiene según el procedimiento definido en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
30
11. Un método para reducir la aparición de envejecimiento o reducir las arrugas, que comprende el uso de una composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
12. Un extracto de *Passiflora alata*, que se prepara según el procedimiento definido en la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
35
13. Un extracto de *Passiflora alata* según la reivindicación 12, para uso como un antiinflamatorio y analgésico.
14. Un extracto de *Passiflora alata* según la reivindicación 12, o para uso como un antiinflamatorio y analgésico según la reivindicación 13, para administración tópica u oral.
15. Un extracto de *Passiflora alata* para uso como un antiinflamatorio y analgésico, para administración tópica u oral.
40

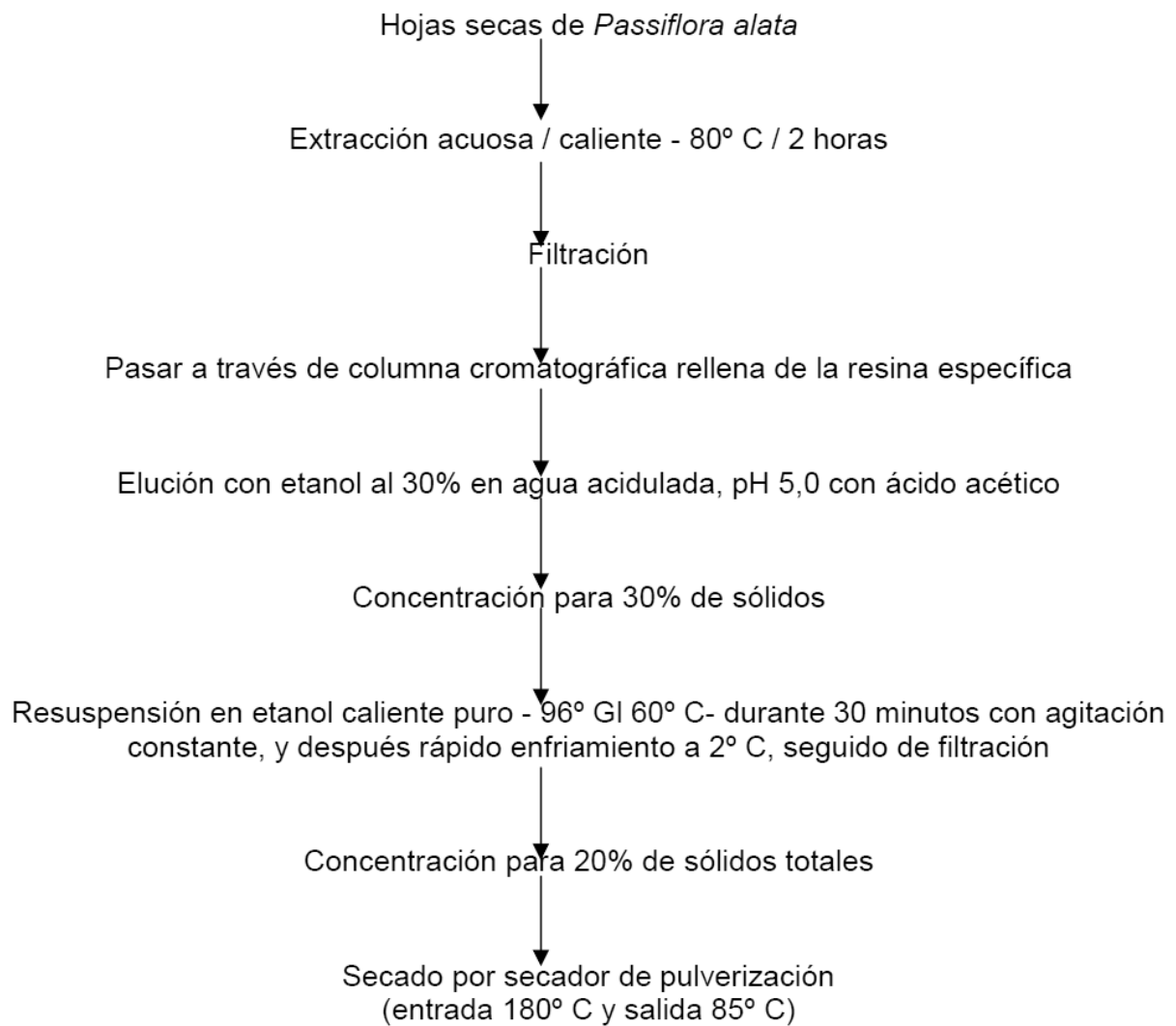


FIGURA 1

Cromatograma de autoescalado

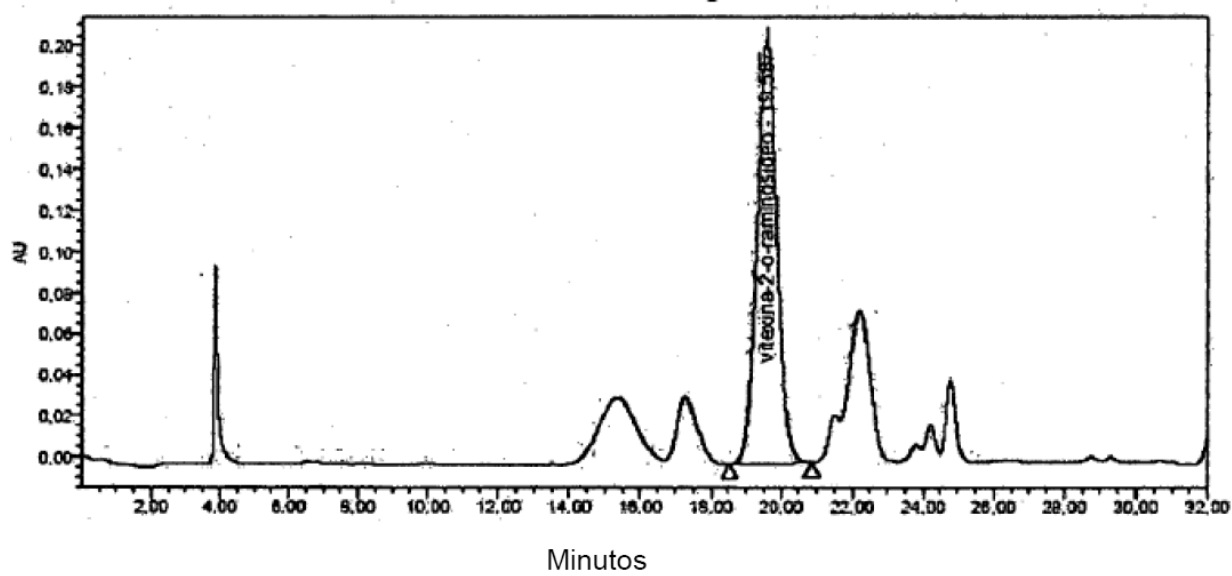


FIGURA 2

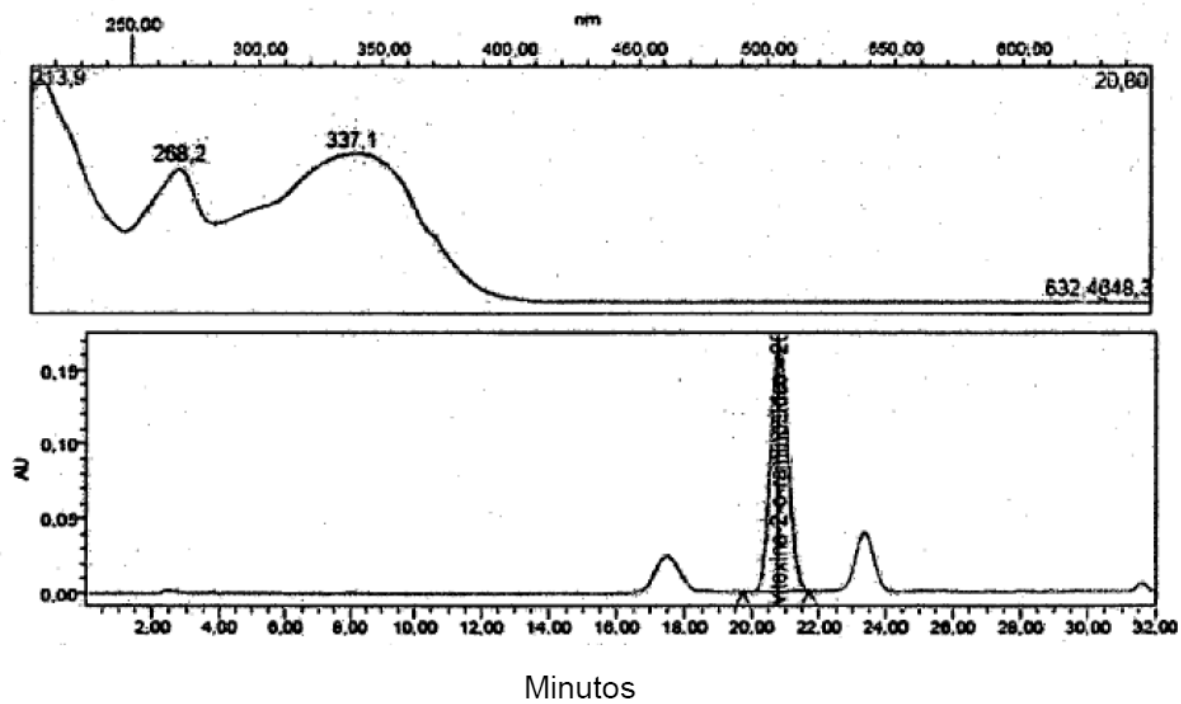


FIGURA 3

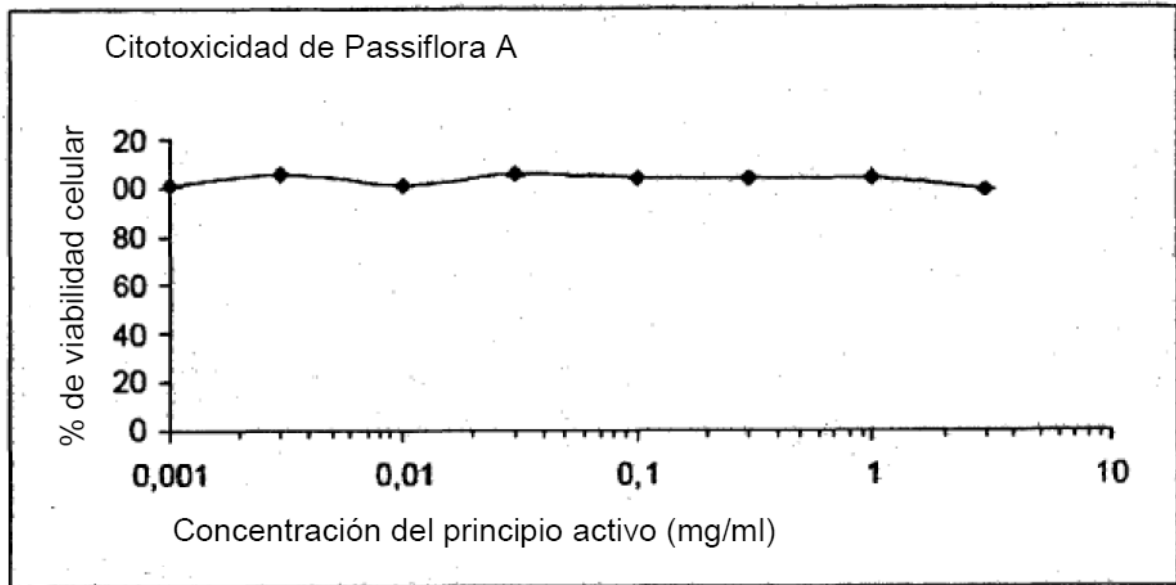


FIGURA 4

Citotoxicidad de la muestra de prueba en células 3T3

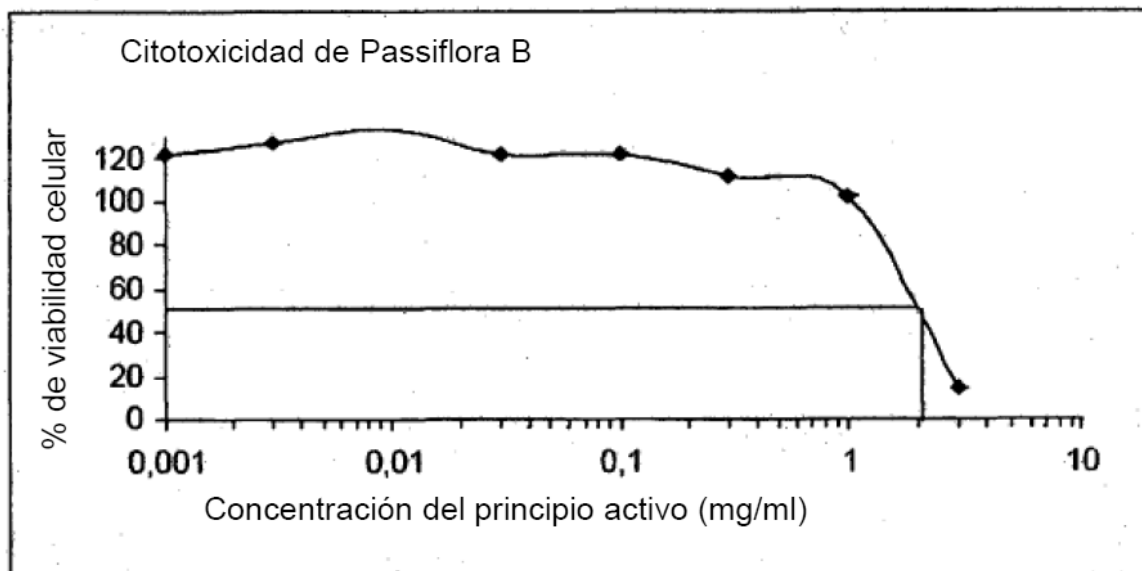


FIGURA 5

Citotoxicidad de la muestra de prueba en células 3T3

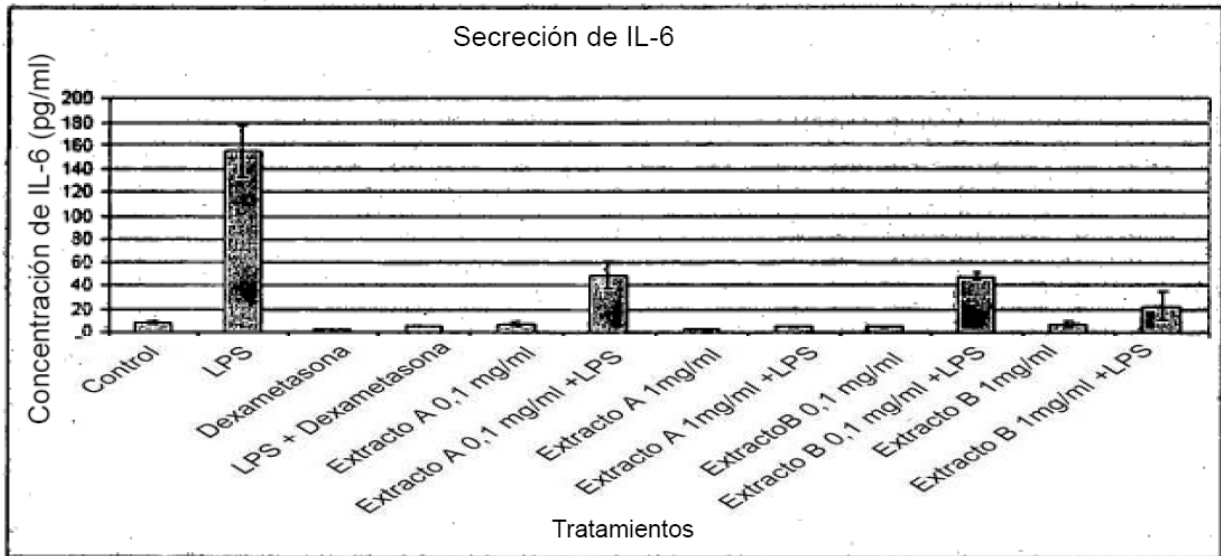


FIGURA 6

Análisis de la secreción de IL-6 por fibroblastos humanos

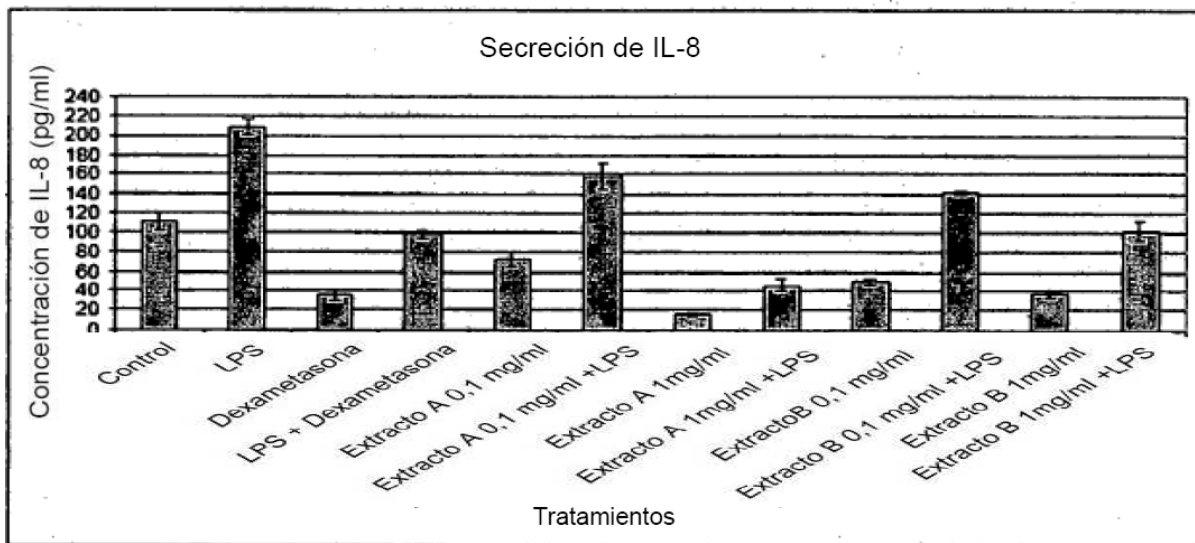


FIGURA 7

Análisis de la secreción de IL-8 por fibroblastos humanos

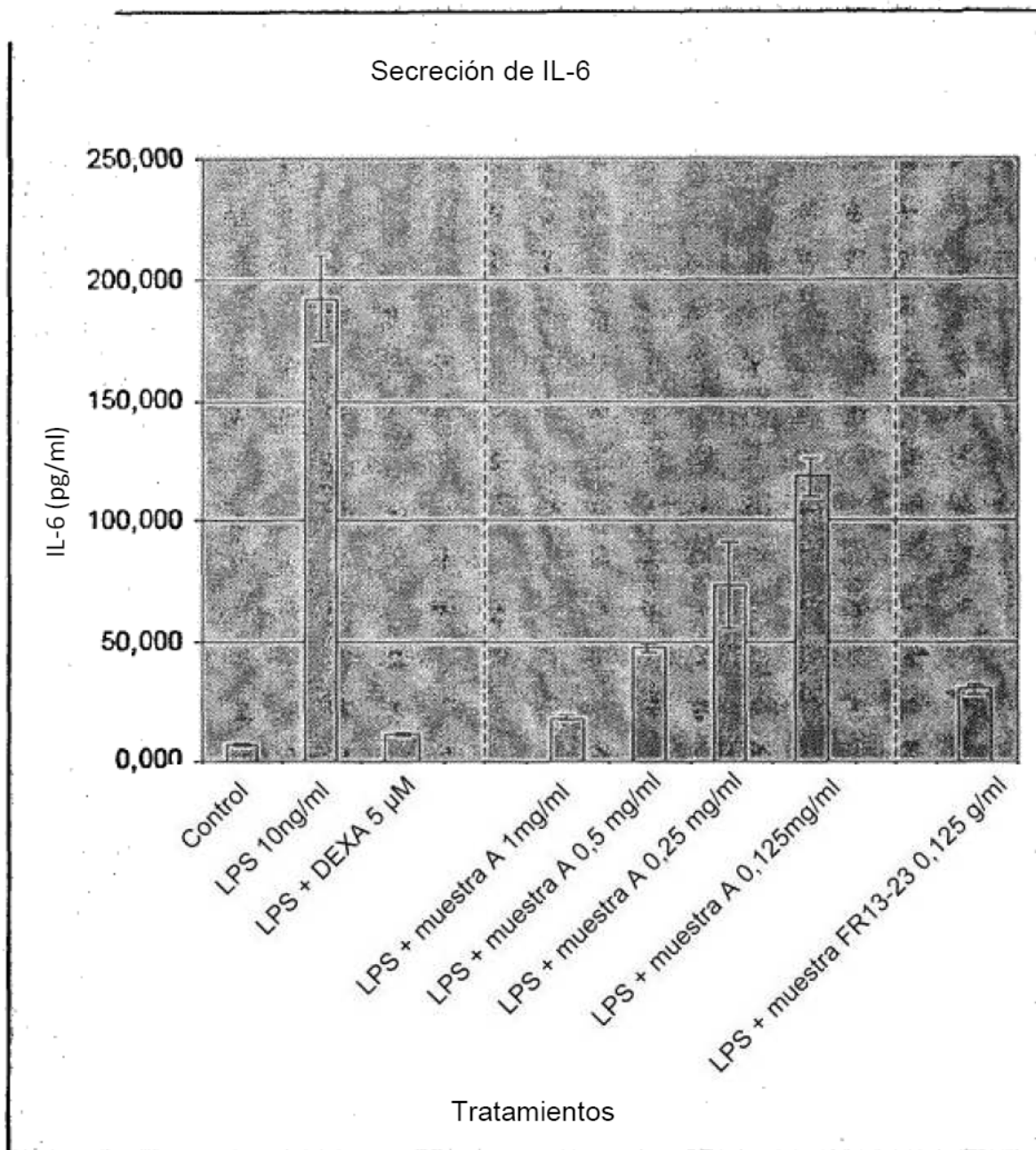


FIGURA 8

Análisis de la secreción de IL-6 por fibroblastos humanos

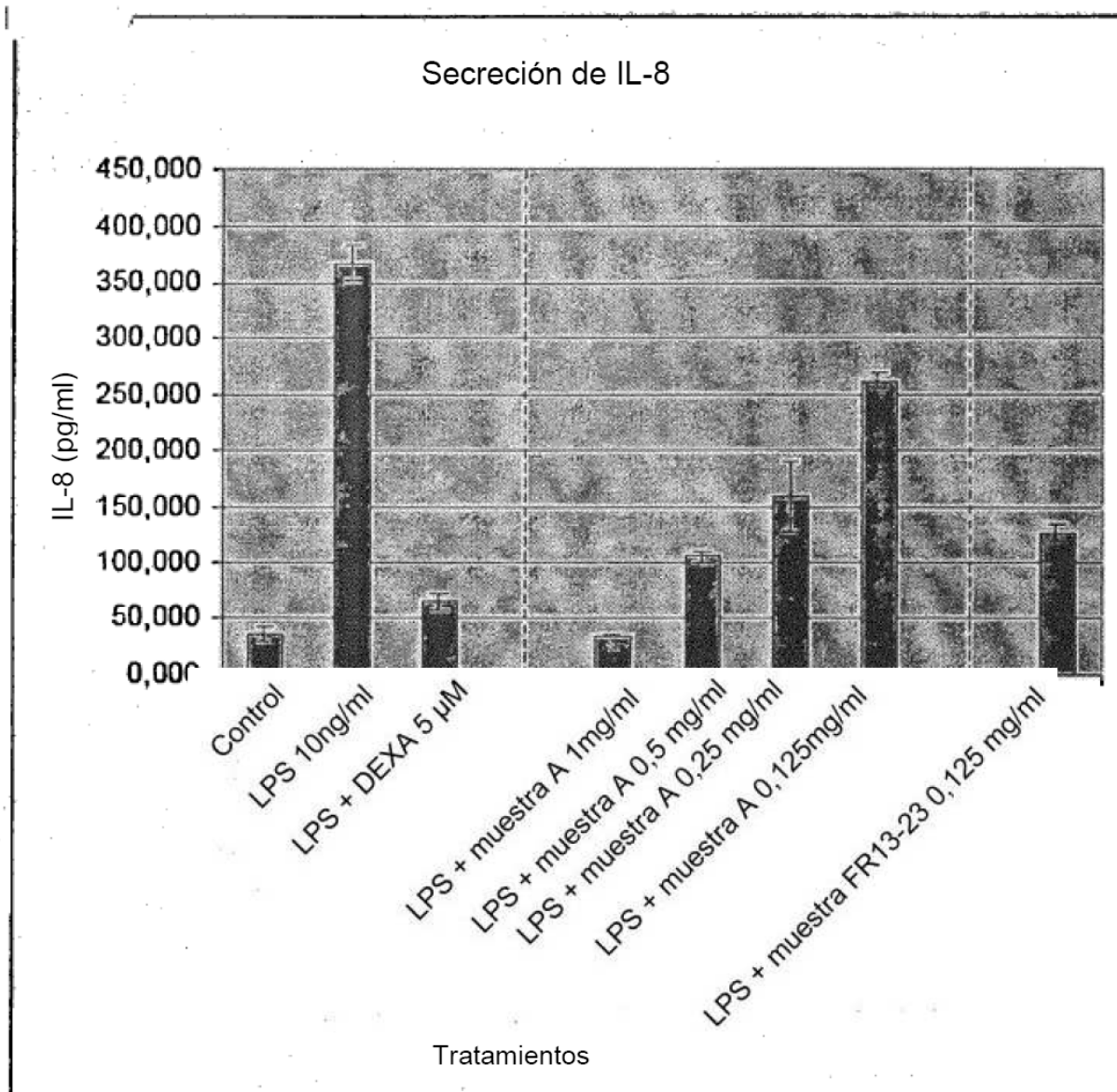


FIGURA 9

Análisis de la secreción de IL-8 por fibroblastos humanos

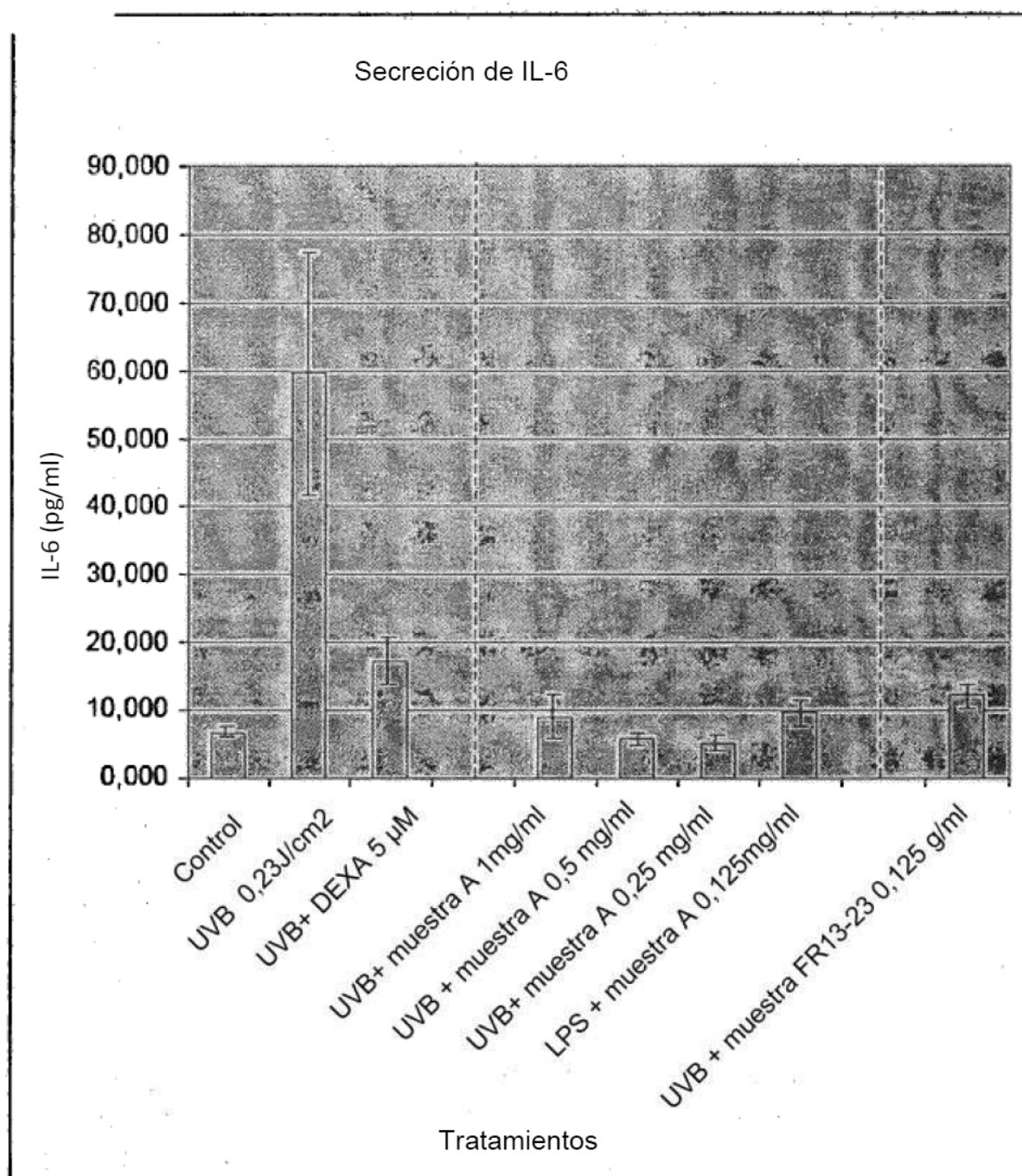


FIGURA 10

Análisis de la secreción de IL-6 por fibroblastos humanos

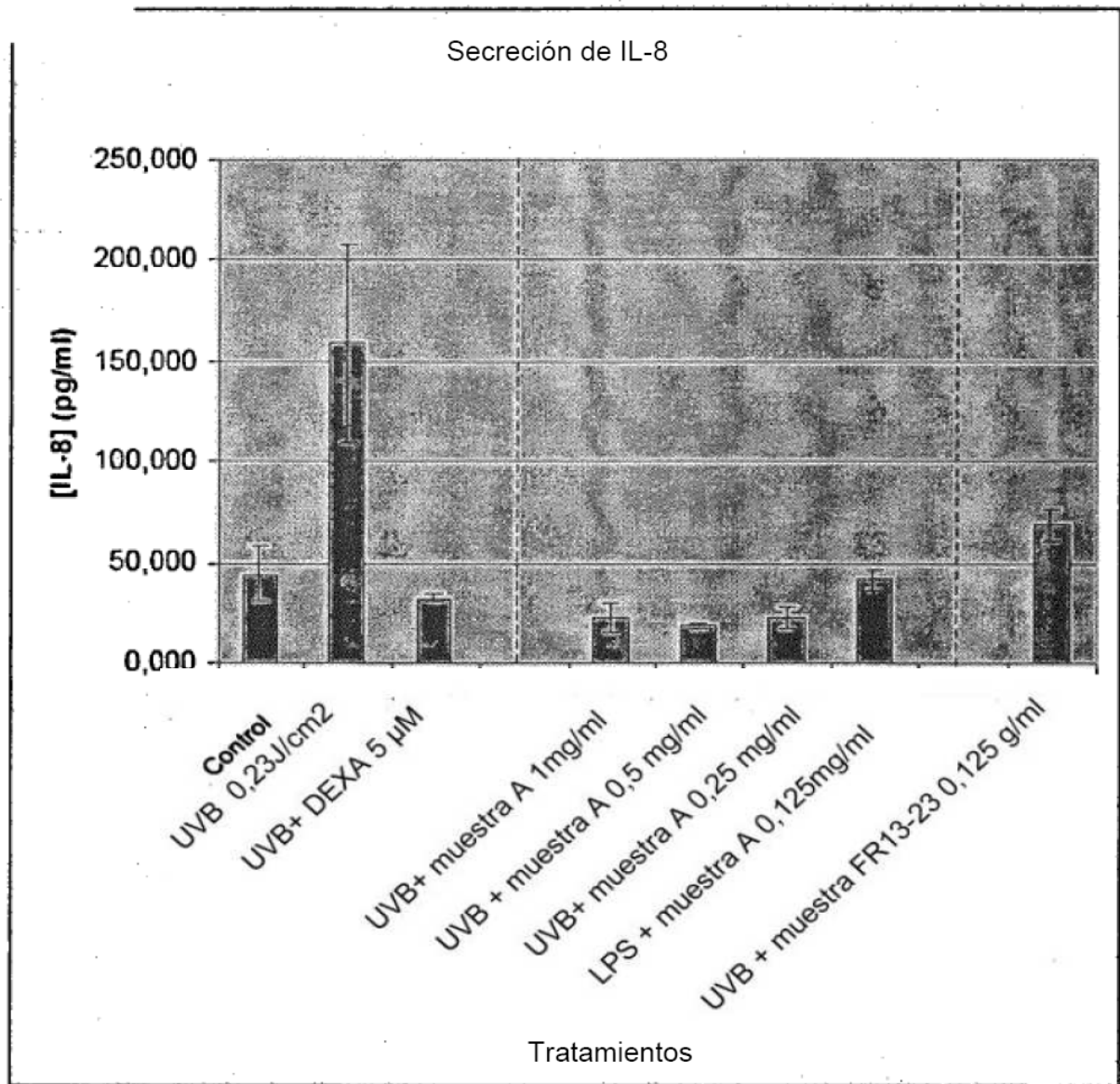


FIGURA 11

Análisis de la secreción de IL-8 en fibroblastos humanos

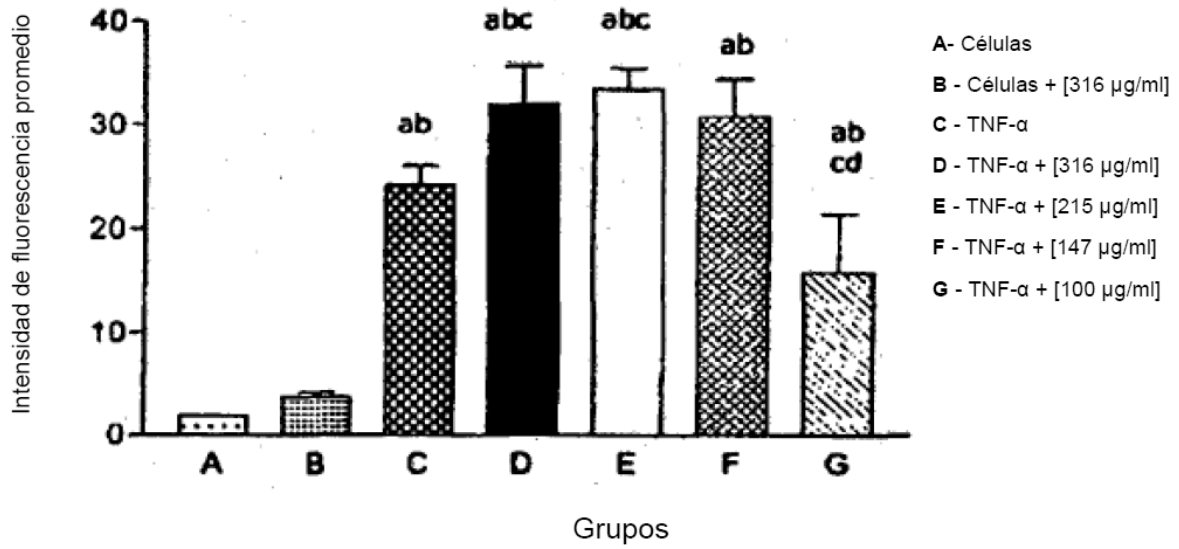


FIGURA 12

Expresión de moléculas de adhesión de ICAM-1 sobre la superficie de células HUVEC.

El significado estadístico está indicado por letras

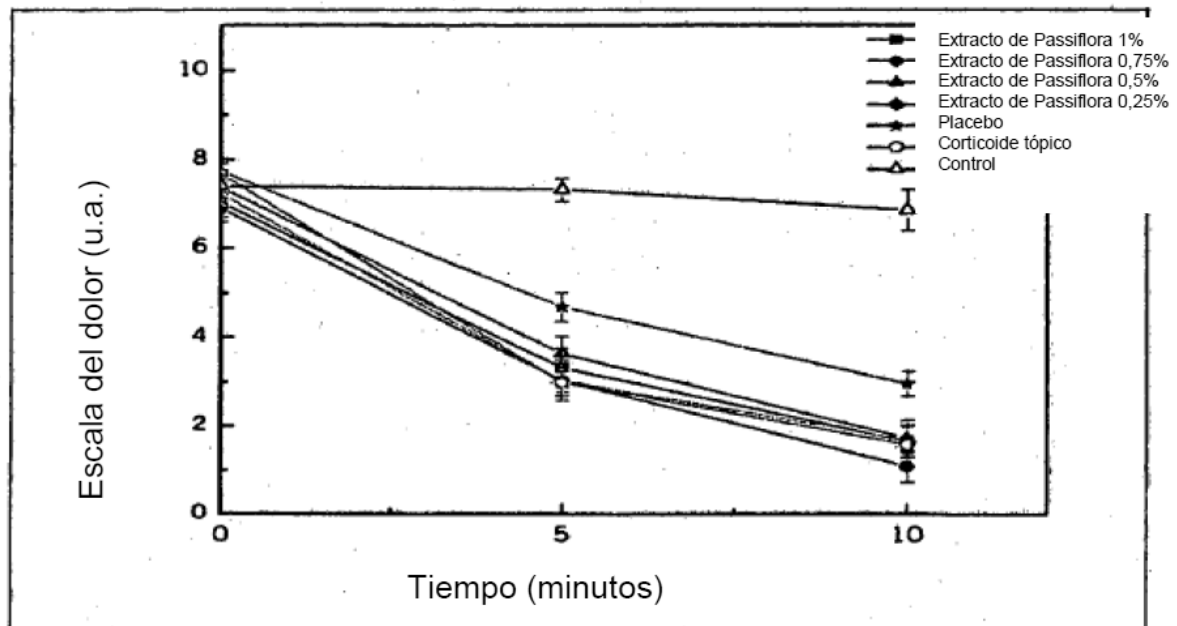


FIGURA 13

Evolución del efecto curativo de los productos en el tiempo.

Error promedio (n= 30 para cada producto)

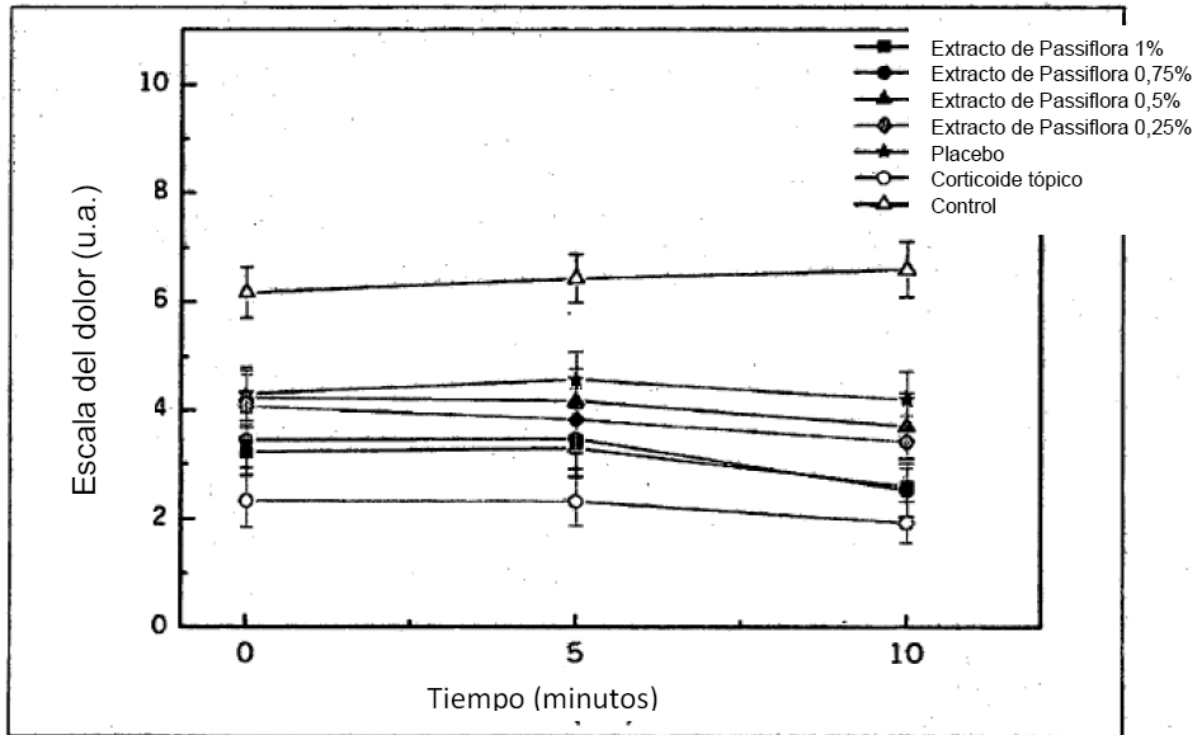


FIGURA 14

Evolución del efecto preventivo de los productos en el tiempo

Error promedio (n = 30 para cada producto)