



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 729**

51 Int. Cl.:
A61K 36/00 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04712497 .9**
86 Fecha de presentación : **19.02.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1648566**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Procedimiento para fabricar composiciones que contienen flavonoides y su uso.**

30 Prioridad: **26.02.2003 DE 103 08 162**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **Universitätsklinikum Freiburg
Hugstetter Strasse 49
79106 Freiburg, DE
NIG Nahrungs-Ingenieurtechnik GmbH**

72 Inventor/es: **Schempp, Christoph, Mathis;
Wähling, Axel y
Lange, Elfriede**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 fabricar composiciones que contienen flavonoides y su uso.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de composiciones de plantas de la familia de las resedáceas que contienen flavonoides. Las composiciones y los productos intermedios que aparecen durante la fabricación se pueden utilizar, de manera ventajosa, para pigmentar textiles naturales y cueros, así como para la fabricación de pigmentos colorantes. Las composiciones y los productos intermedios que aparecen durante la fabricación se pueden utilizar, igualmente, en cosmética y como medicamentos.

La familia de las resedáceas comprende, entre otros, las especies botánicas *Reseda alba* L., *Reseda glauca* L., *Reseda lutea* L., *Reseda odorata* L., *Reseda phyteuma* L. y *Reseda luteola* L. Desde hace siglos se utiliza *Reseda luteola*, llamada también gualda, para la tinción de textiles naturales en tonos amarillos y verdes, también en combinación con otras plantas colorantes. Hasta el siglo XX se utilizó la planta para teñir la seda. H. Schweppe (*Handbuch der Naturfarbstoffe*, [Manual de colorantes naturales], Editorial ecomed, (1993) describe la aplicación, analítica y desarrollo histórico del empleo de esta planta en la tinción de textiles. Posteriormente, el colorante fue sustituido completamente por colorantes sintéticos.

Reseda luteola es una planta de cultivo sencillo, que prefiere los suelos calizos. Recientes trabajos de investigación de Vetter y Biertümpfel (Libros de Actas 1997 y 1999 del Foro Plantas Colorantes; FNR Gülzow) sobre el cultivo de *Reseda luteola* en Alemania ponen de manifiesto su potencial agrícola como materia prima reproducible.

Reseda luteola contiene, además de los componentes principales azúcar, albúminas y material de lastre, sustancias vegetales secundarias, entre las que los flavonoides son interesantes. Entre otros, se han detectado los flavonoides luteolina, apigenina, 7-glucósido de luteolina y 3,5-glucósido de luteolina (H. Schweppe, *Handbuch der Naturfarbstoffe*, Editorial ecomed, 1993; L. Adam, *Libro de Actas del Foro Plantas Colorantes*, 1999; K. Loest, Informe final del proyecto de investigación FNR 97NR147-F, 2001).

La luteolina que contiene *Reseda luteola* representa el principio colorante. Pertenece al grupo de los flavonoides, que son sustancias vegetales extendidas por todo el reino vegetal. Los flavonoides poseen una multitud de actividades biológicas. Por ejemplo, se ha informado de una acción cardioprotectora para la luteolina al impedir la oxidación de los lípidos e inhibir la síntesis de colesterol (Cook *et al.* (1996), *Nutritional Biochemistry* 7, 66; Pietta (2000), *J. Nat. Prod.* 63, 1035). Adicionalmente, se conoce una acción analgésica y antiinflamatoria de luteolina (Toreda *et al.* (1994), *Z. Naturforschung*, C49, 35). Además, se han descrito los efectos estabilizadores de los mastocitos de flavonoides tales como luteolina y quercitina (Kimata *et al.* (2000), *Chemical and Experimental Allergy*, 30, 501). *In vitro*, se han descrito numerosos efectos citostáticos de luteolina y otros flavonoides.

Adicionalmente, se conoce una acción antibacteriana de luteolina (Pettit *et al.* (1996), *J. Ethnopharmacol.* 53, 57) y una acción antioxidante de los flavonoides (Pietta (2000), *J. Nat. Prod.* 63, 1035). El documento WO 00/26206 A1 describe un procedimiento para la preparación de luteolina y derivados de la misma. En el campo de la cosmética dermatológica, se utilizan diversos antioxidantes tales como vitamina C y vitamina E. Además, se usan retinoides para retrasar el fotoenvejecimiento de la piel. Los extractos vegetales de *Potentilla erecta* mejoran en lo posible la cohesión entre la epidermis y la membrana basal, y pueden dar lugar al estiramiento de la piel (documento WO 98/19664).

La tinción con colorantes vegetales se limita en la actualidad a los campos de la artesanía y las artes artesanales. En estos casos, se utilizan decocciones acuosas de partes de la planta para la tinción. Este procedimiento presenta dos inconvenientes importantes. Los colorantes de las plantas se disuelven de modo sólo insuficiente, dado que, en especial, las agliconas luteolina y apigenina son escasamente solubles en agua. Un inconveniente adicional es el uso de partes de la planta que no resulta posible en las máquinas de alto rendimiento que se utilizan en las empresas de transformación que trabajan a escala industrial. La fabricación sintética de luteolina es laboriosa y cara. El documento FR 2 632 523 A1 da a conocer la extracción de diferentes plantas con soluciones etanólicas, agua o hexano.

Una misión de la presente invención es poner a disposición una composición que contiene flavonoides, con un contenido estandarizado en flavonoides, en especial en luteolina.

Sorprendentemente, se ha encontrado que se obtienen composiciones con un alto contenido en luteolina por medio de la extracción previa del material vegetal con una solución acuosa, antes de proceder a la extracción de la planta de reseda con un disolvente. Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición que contiene flavonoides, que comprende: a) someter el material de al menos una planta de las resedáceas a una extracción previa con una solución acuosa; b) extraer con un primer disolvente, que es una solución con una fracción de 15 hasta 100% de disolvente orgánico polar en agua, el material vegetal del residuo obtenido en la etapa a), y c) separar al menos una parte del primer disolvente del extracto obtenido en la etapa b), para obtener una composición con un contenido en luteolina de al menos 10%.

El material vegetal utilizado puede proceder de cualquier planta de la familia de las resedáceas. Ejemplos son las especies botánicas *Reseda alba* L., *Reseda glauca* L., *Reseda lutea* L., *Reseda odorata* L., *Reseda phyteuma* L. y *Reseda luteola* L. Se prefiere *Reseda luteola* L. Asimismo, es posible utilizar mezclas de materiales de múltiples especies vegetales. El material puede ser cualquier parte de las plantas, pero, preferentemente, se usan las partes aéreas

ES 2 305 729 T3

de las plantas, por ejemplo, tallo, hojas, semillas y/o flores. En este caso, el material se puede usar de formas diferentes, por ejemplo, como material fresco, sin que haya sido tratado todavía. Sin embargo, es conveniente utilizar el material en forma desecada. En este caso, el material vegetal se puede presentar ya triturado.

5 De acuerdo con una forma de realización de la invención, el material vegetal se somete, antes de la extracción con un primer disolvente, a una extracción previa con una solución acuosa, y el residuo obtenido de material vegetal se continúa procesando. La solución acuosa está compuesta por al menos 80%, preferentemente al menos 85%, de forma más preferente por al menos 90%, de modo todavía más preferente por al menos 95% y, de manera todavía más preferente, por al menos 98% de agua. De forma muy especialmente preferida, la extracción previa se lleva a cabo
10 con agua. En este caso, puede ser agua del grifo, agua destilada o agua de otro origen. La temperatura de la solución acuosa es, preferentemente, 15 a 90°C, de forma más preferente 15 a 80°C y, de manera muy especialmente preferida, de aproximadamente 15 a 40°C. El valor de pH de la solución acuosa no está especialmente limitado, preferentemente se ajusta mediante la adición de los correspondientes reactivos a un pH de 4,5 hasta 9 y, de forma más preferente, a pH 5,5 hasta 8. La solución acuosa puede contener sales o sustancias tampón. Adicionalmente, puede contener cantidades
15 reducidas de otros disolventes tales como, por ejemplo, disolventes orgánicos polares. La extracción previa se lleva a cabo, en condiciones normales, de forma exhaustiva. El extracto previo acuoso se puede utilizar con fines colorantes o con propósitos farmacéuticos. El extracto previo acuoso se puede someter a procedimientos de desecación conocidos por el experto. A continuación, el material vegetal sometido a la extracción previa se extrae con un primer disolvente.

20 El primer disolvente es una solución con una fracción de 15 a 100% de disolvente orgánico polar en agua. Si no se indica lo contrario, los datos porcentuales en esta solicitud se refieren a porcentajes en peso. De este modo, el primer disolvente puede ser un disolvente orgánico polar básicamente puro (al 100%). Puede ser también una mezcla de una solución acuosa y al menos un disolvente orgánico polar.

25 Disolventes orgánicos polares en el sentido de la presente solicitud comprenden alcoholes, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, aldehídos, nitrilos, nitrocompuestos, sulfóxidos y compuestos orgánicos con una constante dieléctrica (20°C) de al menos 2,5, preferentemente al menos 5 y, de forma muy especialmente preferida, de al menos 10. Preferentemente, el disolvente orgánico polar es miscible con agua en cualquier relación.

30 Los disolventes orgánicos polares, en el sentido de la presente solicitud, no están especialmente limitados; preferentemente, son alcoholes o cetonas. De forma especialmente preferida son alcoholes con 1 hasta 4 átomos de carbono o cetonas con 1 hasta 4 átomos de carbono. Ejemplos de disolventes orgánicos son metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, etilenglicol, acetona, butanona o cualquier mezcla de los citados disolventes. De forma muy especialmente preferida, los disolventes orgánicos polares son metanol, etanol, isopropanol o acetona.
35

El primer disolvente, que se utiliza en la etapa b), es una mezcla de una solución acuosa y al menos un disolvente orgánico polar. En este caso, por lo general, el disolvente orgánico polar representa en la mezcla una fracción de 15 hasta 95%. Se prefiere una fracción de disolvente orgánico polar de 20 hasta 90%, más preferentemente de 30 hasta 80% y, de forma muy especialmente preferida, de 40 hasta 70%. Los disolventes orgánicos polares en la mezcla se
40 corresponden con los disolventes orgánicos polares preferidos indicados anteriormente. Es especialmente preferida una mezcla de agua/alcohol o de agua/cetona.

La extracción puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos, por ejemplo, por maceración, percolación o digestión. La extracción puede ser continua, discontinua, de una o de múltiples etapas (*Diccionario Farmacéutico*,
45 1993, 7ª edición, Editorial de Gryter, Berlín). Al final, se separa habitualmente material vegetal no disuelto.

La temperatura durante la extracción es, normalmente, de 20 hasta 95°C, preferentemente 20 hasta 80°C y, de forma muy especialmente preferida, de 30 hasta 70°C. El método más sencillo para ajustar la temperatura durante la extracción consiste en calentar el agente de extracción, antes de la extracción, a la temperatura deseada. El experto sabe
50 muy bien que el límite superior de la temperatura queda determinado por el punto de ebullición del primer disolvente o del disolvente orgánico polar en la mezcla.

El extracto vegetal obtenido de esta forma puede concentrarse, separando al menos una parte del primer disolvente. Esto se puede llevar a cabo de diversas maneras. El término "extracto" designa una composición obtenible por un
55 procedimiento de extracción.

Por ejemplo, el extracto obtenido se puede concentrar convenientemente al vacío, de modo que se separa del extracto al menos una parte del disolvente orgánico polar. En este caso, después de enfriar, se puede formar un precipitado en el recipiente. Éste se puede recuperar por filtración, separación u otras técnicas procedimentales adecuadas. La fase
60 acuosa remanente tras la destilación se puede procesar completamente por concentración y/o desecación también sin separar el precipitado. La desecación del precipitado separado o de la fase acuosa completa se puede llevar a cabo por procedimientos de desecación conocidos tales como, por ejemplo, secado por pulverización, secado sobre lecho fluidizado, liofilización o secado al vacío, para obtener el producto en forma de polvo. La desecación puede efectuarse tanto sin como con la adición de coadyuvantes para el secado tales como, por ejemplo, jarabe de glucosa o maltodextrina.
65 Sin embargo, el tipo del coadyuvante para el secado no está especialmente limitado.

Es igualmente posible provocar una precipitación, por ejemplo, por refrigeración, adición de agua o acidificación de la solución. El precipitado que se forma representa, entonces, el producto obtenido en la etapa c), y se le puede

recuperar por procedimientos habituales. Más tarde, en la recuperación del precipitado, se separa al menos una parte del primer disolvente.

Por lo general, en la etapa c) se produce una reducción de volumen de extracto procedente de la etapa b). Preferentemente, el volumen del extracto se reduce a menos de 50% del volumen original, más preferentemente a menos de 10% y, de forma especialmente preferida, a menos de 5%. El producto obtenido en la etapa c) puede ser un sólido, por ejemplo, un polvo, un concentrado o una suspensión.

Después de las etapas b) y c) se obtiene una composición que ya está enriquecida en flavonoides.

Se ha encontrado, de forma sorprendente, que se pueden obtener composiciones con un contenido todavía más alto de luteolina cuando, después de la extracción con el primer disolvente, se concentra el extracto obtenido, se recoge en un disolvente y, finalmente, precipita.

De acuerdo con esta forma de realización, el producto obtenido en la etapa c) se recoge en un segundo disolvente y, a continuación, se produce una precipitación de producto enriquecido en flavonoides, de manera que se obtiene un sólido. La precipitación se puede llevar a cabo por acidificación, refrigeración y/o adición de agua. Estas medidas se pueden adoptar aisladas o en combinación.

El segundo disolvente es una solución con una fracción de 0 hasta 100% de disolvente orgánico polar en agua. El segundo disolvente puede ser una solución acuosa sin disolvente orgánico polar (0%). Por último, se puede utilizar, una vez más, también una mezcla de solución acuosa y al menos un disolvente orgánico polar. Los disolventes orgánicos polares utilizables y preferidos, tal como han sido descritos para el primer disolvente, son válidos también para el segundo disolvente.

El producto obtenido en la etapa c) se disuelve hasta donde es posible en el segundo disolvente. El experto sabe que la solubilidad está influida por el valor de pH y/o la temperatura. De esta forma, el valor de pH del segundo disolvente se puede modificar. Preferentemente, se ajusta a un valor de pH de 5 hasta 12, per de 6 hasta 10, más preferentemente de 7 hasta 8. El ajuste del valor de pH se puede efectuar por medio de tampones o álcalis adecuados, en donde los álcalis preferidos son, por ejemplo, sosa cáustica, amoníaco, o hidrógeno-carbonato sódico. La temperatura del segundo disolvente puede ser mayor que la temperatura ambiente. De esta forma, el segundo disolvente se puede ajustar a una temperatura de 30 hasta 100°C, preferentemente a 40 hasta 80°C y, más preferentemente, a 50 hasta 80°C.

Después de la disolución del producto en el segundo disolvente, hasta donde es posible, se pueden separar, eventualmente, componentes insolubles. Para ello se pueden utilizar procedimientos conocidos tales como filtración, centrifugación, etc. Después de disolver el producto en el segundo disolvente, hasta donde es posible, se puede lograr por diferentes medidas que se forme un precipitado enriquecido en flavonoides. Estas medidas comprenden, sobre todo, la acidificación de la solución, la refrigeración de la solución y/o la adición de agua. Estas medidas se pueden aplicar aisladas o en combinación.

Si la solución se acidifica tras la disolución, esto se hace, preferentemente, por la adición de HCl. El valor de pH ajustado de este modo es, preferentemente, de 1 a 6, más preferentemente de 2,5 hasta 6 y, de forma muy especialmente preferida, de 3 hasta 5.

Si la solución se refrigera, la temperatura establecida es menor que 20°C, preferentemente menor que 15°C y, más preferentemente, menor que 10°C. Habitualmente, la solución no se refrigera por debajo de 0°C, preferentemente no por debajo de 4°C. Los límites superior e inferior establecidos para la temperatura se pueden combinar entre sí de cualquier forma.

Si se agrega agua a la solución, normalmente se trata de agua destilada. No obstante, también puede ser agua no destilada. Del mismo modo, el agua puede ser una solución acuosa con una o múltiples sustancias, por ejemplo puede contener sales, tampones u otras sustancias. La relación volumétrica de solución:agua es, por lo general, de 1:100 hasta 100:1, preferentemente 1:10 hasta 10:1 y, de forma muy especialmente preferida, de 1:3 hasta 3:1.

Si el líquido sobre el que se recoge el producto obtenido en la etapa c) es una solución acuosa sin disolvente orgánico polar, éste tiene habitualmente un valor de pH de 6 hasta 10. El valor de pH se puede ajustar también por la adición de álcalis. Preferentemente, la solución acuosa tiene un valor de pH de 7 hasta 8. La temperatura de la solución acuosa es normalmente de 20 hasta 80°C, preferentemente 40 hasta 75°C, más preferentemente mayor que 50 hasta 70°C. La solución acuosa se pone en contacto con el producto obtenido en la etapa c), el cual puede ser un polvo o un concentrado. De esta manera, se disuelve al menos una parte del producto. Los componentes eventualmente insolubles bajo estas condiciones se pueden separar por filtración, centrifugación, separación, decantación u otros métodos de separación habituales. La solución obtenida de este modo se ajusta, entonces, a un valor de pH ácido. El valor de pH ácido es, preferentemente, 2,5 hasta 6,0, más preferentemente ,0 hasta 5,0. El ajuste de pH ácido tiene lugar, habitualmente, por adición de HCl. De esta manera, se forma un precipitado. Preferentemente, el precipitado se forma después de refrigerar la solución. En este caso, la solución se puede enfriar a menos de 20°C, preferentemente a 4 hasta 15°C y, más preferentemente, a 4 hasta 10°C. El precipitado que se forma se puede recuperar del modo descrito anteriormente. Este precipitado contiene, por lo general, 25 hasta 30% de luteolina. Si no se indica lo contrario, los datos referidos al contenido en luteolina se refieren siempre a la sustancia seca de los extractos (soluciones, concentrados o polvo).

ES 2 305 729 T3

Según otra forma de realización, el producto obtenido en la etapa c) se recoge con una solución acuosa exenta de disolvente orgánico polar, a temperaturas de 30 hasta 100°C, preferentemente 50°C hasta 90°C y, de forma muy especialmente preferida, de 60°C hasta 80°C. El concentrado se disuelve hasta donde es posible en esta solución calentada. Después de refrigerar la solución, se forma un precipitado, que se puede recuperar y secar de manera correspondiente. Preferentemente, se enfría a menos de 20°C, más preferentemente a menos de 15°C y, de forma muy especialmente preferida, a menos de 10°C. De acuerdo con esta forma de realización, no es necesario acidificar para la formación del precipitado.

En una forma de realización adicional, el segundo disolvente contiene un disolvente orgánico polar. Habitualmente, se trata de una solución con una fracción de 5 a 100% de disolvente orgánico polar en agua. Se ha encontrado que, por medio de una mezcla que contiene 50 hasta 100% de disolvente orgánico polar en una solución acuosa, se puede lograr un incremento especial de la concentración en luteolina. Preferentemente, la mezcla tiene una fracción de disolvente orgánico polar de 60 hasta 100% y, de forma muy especialmente preferida, de 70 hasta 100%. El disolvente orgánico polar es, preferentemente, un alcohol. La mezcla tiene, por lo general, una temperatura de 20 hasta 80°C, preferentemente tiene una temperatura que se corresponde con la temperatura de ebullición del disolvente orgánico polar, o hasta 10°C menor. Después de poner en contacto el producto obtenido en la etapa c) con la mezcla (segundo disolvente) y disolverlo hasta donde es posible, se agrega agua a la solución eventualmente filtrada con clarificador. En este caso, se forma un precipitado que contiene, en especial, agliconas. Estos precipitados se pueden procesar, entonces, de la manera descrita anteriormente. Según esta forma de realización, se pueden obtener composiciones con un contenido en luteolina de aproximadamente 30 hasta 40%. Si la solución se enfría antes de la adición de agua, se puede formar un precipitado más ligero que, eventualmente, se puede separar. Adicionalmente, antes de la adición de agua, el disolvente orgánico polar se puede separar parcial o totalmente, por ejemplo, por destilación. El residuo se diluye, entonces, con agua, con lo que se forma el precipitado.

En una forma de realización especial, se puede combinar la refrigeración de la solución y la adición de agua para lograr la precipitación. De este modo se pueden obtener también composiciones con aproximadamente 30 hasta 40% de luteolina.

Es posible lograr un incremento adicional, en especial de la parte de aglicona de la composición, recogiendo el producto obtenido en la etapa e) nuevamente en una mezcla compuesta por una solución acuosa y al menos un disolvente orgánico polar. Esta disolución tiene lugar, de manera ventajosa, a temperaturas de 30 hasta 80°C. Por medio de la adición de agua al correspondiente extracto de disolvente resultó posible recuperar un precipitado con un contenido en flavonoides adicionalmente enriquecido. Este precipitado se puede obtener y secar de la forma descrita. Este producto contiene aproximadamente 35 hasta 45% de luteolina. Esta etapa se puede repetir nuevamente con el producto obtenido de esta manera.

Se ha encontrado, igualmente, que en la realización de las etapas d) y e) se puede renunciar a una extracción previa del material vegetal con una solución acuosa.

Por lo tanto, la invención se refiere también a un procedimiento para fabricar una composición que contiene flavonoides con un contenido en luteolina de al menos 10%, que comprende

- a) la extracción de material de al menos una planta de la familia de las resedáceas, con un primer disolvente que es una solución con una fracción de 15 hasta 100% de disolvente orgánico polar en agua; b) separación de al menos una parte del primer disolvente del extracto obtenido en la etapa a); c) recogida del producto obtenido en la etapa b) en un segundo disolvente y, eventualmente, separación de los componentes insolubles; y d) acidificación, refrigeración y/o mezcla con agua de la solución obtenida en la etapa c), de manera que se obtiene un sólido. Para las distintas etapas son válidas las variantes y formas de realización preferidas descritas anteriormente.

La invención se refiere, adicionalmente, a composiciones que contienen flavonoides, obtenibles por medio de un procedimiento según la presente invención. Los extractos vegetales y las composiciones que contienen flavonoides obtenidos de esta forma se pueden utilizar convenientemente para la tinción de textiles y cuero, así como para la fabricación de pigmentos colorantes. También se les puede usar en cosmética y medicamentos.

A través del procedimiento según la invención es posible poner a disposición composiciones que contienen flavonoides (extractos vegetales) con un contenido estandarizado en flavonoides, en especial el contenido en luteolina. Las composiciones (extractos vegetales) obtenidas de este modo exhiben un elevado contenido en luteolina de al menos 10%, preferentemente de al menos 20%, más preferentemente de al menos 30%, de forma todavía más preferida de al menos 35% y, de manera especialmente preferida, de al menos 40% de luteolina. Estas composiciones o extractos vegetales son, asimismo, objeto de la invención. Los extractos contienen, preferentemente, otros flavonoides adicionales tales como, por ejemplo, apigenina, 7-glucósido de luteolina o 3,7-glucósido de luteolina.

Las composiciones que contienen flavonoides según la invención tienen, preferentemente, un contenido en flavonoides de 20 hasta 90% referido a la composición total. De forma más preferida, el contenido en flavonoides es mayor que 20%, de forma más preferida, mayor que 50% y, de manera especialmente preferida, mayor que 60%.

Adicionalmente, y de forma sorprendente, se ha encontrado que por medio de un tratamiento con extractos de la planta *Reseda luteola* (gualda) es posible mejorar de forma significativa estados no deseados de la piel, y se puede alcanzar un estiramiento y alisamiento de la piel. En especial, mediante la administración local de extractos de reseda se obtiene una mejoría significativa de los síntomas de neurodermitis.

Un objeto adicional de la invención es, por lo tanto, el uso de un extracto de al menos una planta de la familia de las resedáceas para el tratamiento o la profilaxis de estados no deseados de la piel, tal como se definen en las reivindicaciones.

Un aspecto de la invención es el uso de extractos de resedáceas para el tratamiento de enfermedades de la piel. A ellas pertenecen, entre otras, neurodermitis, eritemas, quemaduras, liquen plano, prurito, psoriasis, pénfigo, penfigoide, dermatitis herpetiforme, esclerodermia, liquen escleroso, dermatitis solar, enfermedad de Favre Racouchaud, queratosis actínicas, elastosis cutánea, acné vulgar, foliculitis simple, y rosácea. La invención se refiere también al uso de extractos de resedáceas para fabricar un medicamento para el tratamiento de enfermedades de la piel.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de extractos de resedáceas como cosméticos. Usos preferidos de esta clase son para el alisamiento de la piel, para el estiramiento de la piel, para la prevención de arrugas, para reducir las arrugas, para reducir la profundidad de las arrugas, para prevenir el envejecimiento de la piel, para tratar el envejecimiento de la piel, para mejorar el aspecto estético de la piel, para prevenir el envejecimiento de la piel inducido por la luz del sol, para prevenir las alteraciones cutáneas provocadas por el medio ambiente, para tratar las alteraciones cutáneas de origen medioambiental, etc. La invención se refiere, también, al uso de extractos de resedáceas para fabricar un cosmético.

En consecuencia, la invención se refiere al uso de un extracto de la planta *Reseda luteola* para mejorar la tersura de la piel o para retrasar o combatir el envejecimiento cutáneo. Para ello, este extracto se puede incorporar en una preparación cosmética con un vehículo cosméticamente aceptable. La preparación resulta especialmente beneficiosa para conseguir el alisamiento de la piel, para retrasar o prevenir la aparición de signos de envejecimiento de la piel, para reducir la formación de arrugas o su profundidad, y para limitar las irritaciones cutáneas. Las preparaciones se pueden utilizar como productos anti-arrugas, como productos contra el envejecimiento de la piel, y como productos para el cuidado de la piel.

Las preparaciones cosméticas según la presente invención son adecuadas para retrasar el envejecimiento cutáneo y luchar contra el envejecimiento de la piel, en especial el envejecimiento causado por la radiación solar. Las preparaciones cosméticas citadas son apropiadas, además, para el tratamiento o la profilaxis de irritaciones de la piel tales como quemaduras solares y eritemas de la piel.

Un uso especialmente preferido de las preparaciones cosméticas o farmacéuticas citadas consiste en su uso para tratar enfermedades de la piel. Las preparaciones según la invención son especialmente apropiadas para el tratamiento de la neurodermitis.

La presente invención describe, asimismo, procedimientos para la fabricación de extractos de reseda con un contenido especialmente elevado en flavonoides. En estas preparaciones, el contenido en flavonoides se encuentra entre 10% y 90%, preferentemente entre 40 y 60%. Son especialmente preferidos los extractos según la invención con un contenido elevado en flavonoides. Como extractos para uso farmacéutico y/o cosmético los extractos fabricados según el procedimiento según la invención, sino que son especialmente preferidos.

Cuando los extractos para el uso farmacéutico o cosmético según la invención no se fabrican de acuerdo con el procedimiento según la invención, pueden ser obtenidos por procedimientos que son conocidos por el experto.

Las preparaciones cosméticas o farmacéuticas, en particular las preparaciones dermatológicas de la invención, contienen preferentemente 0,001% a 10%, preferentemente 0,01% a 10%, más preferentemente 0,1% a 10% y, de forma especialmente preferida, 1 a 5% en partes en peso de los citados extractos de *Reseda luteola* u otras especies de reseda, en relación con el peso total de la preparación.

Las mencionadas preparaciones según la invención pueden contener, de manera conveniente, otros aditivos, en especial al menos una sustancia que estimule la síntesis de los componentes básicos de la matriz extracelular de la piel. Ejemplos de tales sustancias son vitaminas, en especial vitaminas de los grupos A y C y sus derivados, tocoferol, xantina, en especial cafeína o teofilina, y retinoides, en especial ácido de vitamina A. Se pueden agregar también, preferentemente, extractos vegetales tales como extractos de *Usnea barbata*, *Viola tricolor*, *Calendula officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, especies de salvia, *Coriandrum sativum* e *Iris germanica*. Otros aditivos adicionales pueden consistir en filtros de fotoprotección, por ejemplo, óxidos de titanio, y filtros de fotoprotección vegetales. El extracto de *Reseda luteola* u otras especies de reseda, que se utiliza para el tratamiento según la invención en preparaciones para limitar las irritaciones de la piel, en especial neurodermitis, puede combinarse, de manera conveniente, con al menos otro principio activo que potencie la función de la barrera cutánea tales como extractos de *Potentilla erecta* y otras preparaciones de material curtierte. Adicionalmente, los extractos de reseda según la invención pueden ser usados convenientemente para estabilizar otras sustancias sensibles a la oxidación. Resulta especialmente ventajosa, por ejemplo, la combinación de hiperforina o de un extracto de hipérico enriquecido con hiperforina con los extractos de reseda según la invención.

La composición farmacéutica o cosmética según la invención puede contener también una sustancia portadora farmacéutica o cosméticamente aceptable. Habitualmente, la sustancia portadora es apropiada para la aplicación tópica, no afecta a la acción del principio activo, y es aceptable desde el punto de vista toxicológico. Sustancias portadoras farmacéuticas adecuadas se describen en la obra *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990), un libro de texto clásico en este campo. La concentración del vehículo en la composición no está particularmente limitada. Puede ser de 5% a 99,99%, preferentemente 25 hasta 99,9%, más preferentemente 50 hasta 99% y, de forma especialmente preferida, de 50 hasta 95%, referido a la composición total.

La composición puede contener otras sustancias opcionales. El *CTFA Cosmetic Ingredient Handbook*, segunda edición (1992), describe múltiples aditivos cosméticos y farmacéuticos que se utilizan en la industria de los productos del cuidado para la piel y de medicamentos para la piel.

Los productos según la invención pueden fabricarse con diversas preparaciones galénicas. Una de las preparaciones más habituales es una preparación tópica, formulada para el uso sobre la piel. Estas formulaciones tópicas de utilidad incluyen, no de forma excluyente, pomadas, emulsiones, cremas, pastas, leches, bálsamos, geles, lociones, tinturas, emplastos, polvos, nebulizadores, espumas y composiciones de maquillaje. El experto conoce diferentes procedimientos para la fabricación de formulaciones tópicas. Se les describe detalladamente en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (véase más arriba) o en la obra *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 6ª edición, Williams & Williams (1995).

La aplicación de las formas de preparación se lleva a cabo, preferentemente, dos veces al día, aplicando las preparaciones en una capa delgada y amasando ligeramente para su penetración. Debido a la buena tolerancia el período de uso no está especialmente limitado.

El uso según la invención de los extractos de reseda se refiere, en consecuencia, a la aplicación de una fracción cosmética o farmacéuticamente eficaz de *Reseda luteola* u otras especies de reseda, en donde el extracto indicado está incorporado en una preparación con un vehículo cosmética o farmacéuticamente aceptable.

Los métodos descritos de este modo permiten el alivio tolerable y eficaz de las irritaciones de la piel, el estiramiento y alisamiento de la piel flácida y arrugada, la prevención o disminución de los daños causados por la luz, y el tratamiento de las quemaduras solares y de la neurodermitis. La invención se refiere a un procedimiento para tratar o prevenir estados no deseados de la piel, en donde un individuo, preferentemente un ser humano, recibe la administración de una cantidad eficaz de un extracto de al menos una planta de la familia de las resedáceas. Adicionalmente, la invención se refiere a un procedimiento para inhibir la proliferación de células mononucleadas activadas (linfocitos), a un procedimiento para inducir la apoptosis, preferentemente de las células mononucleadas activadas (linfocitos), a un procedimiento para inhibir la ciclooxigenasa, a un procedimiento para estimular los fibroblastos y/o a un procedimiento para inhibir la toxicidad inducida por los rayos UVA-1, en donde un individuo correspondiente recibe la administración de una cantidad eficaz de un extracto de al menos una planta de la familia de las resedáceas. Las distintas formas de realización en esta solicitud se pueden combinar entre sí. Otros requisitos, propiedades y ventajas de la invención resultan fácilmente deducibles para el experto en el campo descrito a partir de los ejemplos.

Figura 1 muestra de forma esquemática la evolución del procedimiento según la invención en una forma de realización determinada. En la etapa A), se lleva a cabo una extracción previa del material vegetal con agua. El material vegetal pre-extraído se somete, en la etapa B), a una extracción con un primer disolvente. El extracto obtenido se concentra y, en la etapa C), se recoge en un 2º disolvente. Después de precipitar, se obtiene un sólido que está enriquecido con flavonoides.

Figura 2 muestra una representación esquemática de diferentes variantes del procedimiento para fabricar un extracto de reseda.

Figura 3a muestra la inhibición de la proliferación de células mononucleadas activadas. Figura 3b muestra que luteolina exhibe la acción inhibitoria de la proliferación más intensa (Ejemplo 6).

Figura 4 muestra la inhibición de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 en comparación con indometacina (Ejemplo 7).

Figura 5a muestra la inducción de apoptosis en células mononucleadas activadas por medio del extracto de reseda. A partir de la Figura 5b se puede ver que luteolina mostró una intensa acción inductora de apoptosis (Ejemplo 12).

Figura 6a muestra la estimulación de la proliferación de fibroblastos por medio del extracto de reseda. En la Figura 6b se muestra que el extracto de reseda conduce a un incremento de la síntesis de colágeno (Ejemplo 14).

En la Figura 7 se representa la inhibición de la toxicidad inducida por UV a través del extracto de reseda (Ejemplo 15).

Los siguientes ejemplos explican la invención con mayor detalle y no la limitan en modo alguno. Sobre la base de los ejemplos experimentales y clínicos se explican las posibilidades de aplicación y el potencial farmacéutico o cosmético de los extractos de reseda.

ES 2 305 729 T3

Ejemplo comparativo 1

Fabricación de un extracto acuoso

- 5 Las partes aéreas de plantas de reseda se extraen en estado seco y triturado en una relación de aprox. 1:5 con agua, a temperatura ambiente. El extracto se filtra, se concentra y/o se seca. El polvo obtenido contiene aprox. 0,5% a 1,5% de luteolina.

Ejemplo comparativo 2

10

Fabricación de un extracto acuoso con adición de álcalis

- Las partes aéreas de plantas de reseda, en estado seco y triturado, se extraen exhaustivamente con agua, con la adición de álcalis a un valor de pH de 7 a 9, a una temperatura de 40°C. El extracto se filtra, se concentra y/o se seca.
15 El polvo obtenido contiene aprox. 2,5% a 5% de luteolina.

Ejemplo comparativo 3

Fabricación de un extracto de disolvente a partir de reseda

20

Las partes aéreas de plantas de reseda, en estado seco y triturado, se extraen exhaustivamente con una mezcla al 50% de etanol/agua, a una temperatura de 50°. Del extracto filtrado, se recupera el alcohol. La fase acuosa obtenida se concentra y se seca. El polvo obtenido contiene aprox. 5% a 10% de luteolina.

Ejemplo 1

Fabricación de un extracto de reseda enriquecido con luteolina

- 30 Las partes aéreas de plantas de reseda, en estado seco y triturado, se extraen con agua, en una relación de aprox. 1:5, a temperatura ambiente. El extracto se filtra, se concentra y se seca. El polvo que se obtiene contiene aprox. 0,5% a 1,5% de luteolina.

- Las partes de la planta pre-extraídas con agua se extraen exhaustivamente en una mezcla al 60% de alcohol/agua, a una temperatura de 50°C. A partir del extracto filtrado se recupera el alcohol. La fase acuosa obtenida se concentra y se seca. El polvo obtenido contiene aprox. 10% a 15% de luteolina.
35

Ejemplo 2

Preparación de un extracto de reseda con un enriquecimiento mayor en luteolina

40

El polvo obtenido en el Ejemplo comparativo 3 se recoge con agua, en una relación de 1:5, a temperatura de ebullición. Después de enfriar la solución, se forma un precipitado, que se puede recuperar por separación, decantación o filtración. Se seca el precipitado. El polvo contiene al menos 25% de luteolina.

Ejemplo 3

Preparación de un extracto de reseda con un enriquecimiento mayor en luteolina

- 50 El polvo que se obtiene en el Ejemplo 1 se recoge con una mezcla al 50% de alcohol/agua, en una relación de 1:7, a 60°C. La composición obtenida se destila para separar el alcohol y se diluye con agua 1:1. Después de enfriar, se forma un precipitado que se puede recuperar por separación, decantación o filtración. El precipitado se seca. El polvo contiene al menos 25% de luteolina.

Ejemplo 4

55

Preparación de un extracto de reseda con un enriquecimiento mayor en luteolina

- Los productos descritos 1, 2, 4 ó 5 (véase la Figura 2) se recogen con agua, en una relación de 1:5, a una temperatura de 70°C. Mediante la adición de NaOH, se ajusta el valor de pH a 7. El extracto se filtra en caliente y se ajusta, por la adición de HCl, a un valor de pH de 4. Después de enfriar la solución, se forma un precipitado, que se puede recuperar por separación, decantación o filtración. Se seca el precipitado. El polvo contiene al menos 25% de luteolina.
60

Ejemplo 5

- 65 *Preparación de un extracto de reseda con un enriquecimiento mayor en luteolina*

Los productos descritos 1, 2, 4 ó 5 (véase la Figura 2) se recogen, en una relación de 1:7, con alcohol o cetona a temperatura de ebullición. La solución se filtra en caliente.

El filtrado se refrigera. A la solución alcohólica enfriada se agrega agua en una relación de 1:3 para la cristalización de los flavonoides. La mezcla se refrigera a temperaturas de 5 a 10°C. Se forma un precipitado, que se puede recuperar de la forma descrita. El precipitado seco contiene al menos 30% de luteolina. Se lleva a cabo una purificación adicional mediante la nueva cristalización del precipitado en alcohol y agua. El polvo obtenido de la forma descrita contiene al menos 40% de luteolina.

Ejemplo 6

Inhibición de la proliferación de células mononucleadas estimuladas por medio de extractos de Reseda luteola

El ensayo se llevó a cabo con los extractos según la invención del Ejemplo 1 (extracto Res0900.02) y del Ejemplo 3 (Extracto Res0502.02). Se tomaron células mononucleadas de la sangre periférica de donantes masculinos sanos sobre un gradiente de densidad de Ficoll, que se cultivaron en Medio RPMI con suero bovino fetal al 5% en placas de microtitulación. Las células se incubaron por triplicado con medio (controles negativos), disolvente (DMSO) o extractos de reseda disueltos en DMSO, a las concentraciones de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, y 1:3200. Tras la adición de los aditivos, las células fueron estimuladas con 1 µg/ml de fitohemaglutinina y se incubaron durante 48 h en la estufa de cultivo. A continuación, se determinó la proliferación celular por medio del contenido en ATP de las células (Via-Light-Test). Se puso de manifiesto una inhibición significativa, dependiente de la dosis, de la proliferación celular con los extractos de reseda. El extracto preparado según el Ejemplo 3 fue claramente más eficaz que el fabricado según el Ejemplo 1. El disolvente careció de toda influencia sobre la proliferación.

En el análisis de los distintos flavonoides contenidos en los extractos, se demostró que la luteolina muestra la acción inhibitoria de la proliferación más intensa (Figura 3b). A tal efecto, se aislaron células mononucleadas aisladas de la sangre periférica de una donante femenina sana sobre un gradiente de densidad de Ficoll, que se incubaron en Medio RPMI con suero bovino fetal al 5% en placas de microtitulación. Las células se incubaron por triplicado con los flavonoides luteolina, 7-glucósido de luteolina y apigenina. Las sustancias puras se disolvieron en etanol al 70% y se continuó su dilución en el medio. Las concentraciones finales fueron de 64, 32, 16, 8, 4, 2, y 0 µg/ml. Después de la adición de los flavonoides, las células fueron estimuladas con 1 µg/ml de fitohemaglutinina, y se incubaron durante 24 h en la estufa de cultivo. Tras la adición de 1 µcurio de ³H-timidina radioactiva, las células se incubaron durante 18 h más y, por último, se midió la radiactividad incorporada en un contador de escintilación (Canberra-Packard).

Ejemplo 7

Inhibición de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y COX-2 por medio del extracto según la invención del Ejemplo 3 (Res0502.02), en comparación con el antiinflamatorio no esteroide indometacina

Como método de detección se utiliza un kit de inhibición enzimática de la Compañía Cayman Chemicals (Número de producto 760111). La realización del ensayo tiene lugar a 25°C con el fin de garantizar una función enzimática óptima. A n tampón de ensayo con un contenido definido en heme, se agrega COX-1 o COX-2 recombinante. Finalmente, se agrega el extracto de reseda Res0502.02 según el Ejemplo 3, en una concentración final de 1:200, o indometacina (concentración final 10 µM) y un sustrato de color. Tras la adición del sustrato enzimático ácido araquidónico, la reacción se lleva a cabo durante cinco minutos, y se mide por colorimetría la reacción del sustrato de color asociada a la formación del endoperóxido PGH2. La reacción enzimática no tratada se define como actividad de 100%, y la inhibición lograda se expresa en relación con ésta. Se demuestra que el extracto de reseda ejerce una inhibición de COX-1 equivalente a la de indometacina y algo más débil sobre COX-2 (Figura 4).

Ejemplo 8

Acción curativa de la crema de Reseda luteola en el tratamiento de la neurodermitis

a) Durante 10 días, se trató con la crema de *Reseda luteola* que se menciona en el Ejemplo 9 a un varón de 31 años de edad, con una neurodermitis de varias semanas de duración en los brazos. Se logró, de esta forma, una curación casi completa de los trastornos de la piel. Adicionalmente, se redujo la profundidad de las arrugas y aumentó la tersura de la piel.

b) Un varón de 22 años con neurodermitis de los codos fue tratado durante una semana con la crema de *Reseda luteola* descrita en el Ejemplo 9. En los controles, se observó una regresión casi completa del enrojecimiento.

c) Una mujer de 24 años con una neurodermitis resistente a la terapia, de muchos años de duración, fue tratada con la crema de *Reseda luteola* descrita en el Ejemplo 9, en comparación con la pomada Protopic® al 0,1%, de intensa acción antiinflamatoria. La crema de *Reseda luteola* se aplicó sobre la muñeca derecha y la crema Protopic®, sobre la muñeca izquierda. En los controles se observó en la piel tratada con la crema de *Reseda luteola* una mejoría de los hallazgos, que fue equivalente a las del lado tratado con Protopic®. En el lado tratado con *Reseda luteola* se observó, adicionalmente, una clara reducción de la profundidad de las arrugas y un estiramiento de la piel.

d) Una mujer de 68 años de edad sufrió un eccema en el rostro con sequedad, descamación y rágades dolorosas. Después de 10 días de tratamiento con crema de *Reseda luteola* según el Ejemplo 9, se produjo la curación de las rágades y una clara regresión del eritema y de la descamación.

ES 2 305 729 T3

Ejemplo 9

Fabricación de una crema de Reseda luteola para el cuidado intensivo de la piel inflamada

5	Extracto de <i>Reseda luteola</i> según el Ejemplo 3	3,0
	Monoestearato de glicerol 60	4,0
10	Alcohol cetílico	6,0
	Triglicéridos de cadena media	7,5
	Escualano	25,5
15	Monoestearato de macrogol-20	7,0
	Propilenglicol	10,0
20	Agua purificada	hasta 100

Los componentes adicionales del extracto de reseda forman la base de la crema. Los componentes de la base de la crema pueden estar presentes en relaciones cuantitativas diferentes de las indicadas. La base de la crema puede comprender otras sustancias y/o sustancias adicionales.

25 Ejemplo 10

Gel de cuidados cosméticos para el tratamiento de arrugas e irritaciones de la piel del rostro

30	Extracto acuoso de <i>Reseda luteola</i> según el Ejemplo 3	1,0 g
	Extracto de <i>Potentilla erecta</i>	0,5 g
35	Carbómero 50.000	0,5 g
	2-Propanol	5,0 g
	Propilenglicol	10,0 g
40	Hidróxido sódico	0,12 g
	Agua purificada	hasta 100

45 Los componentes adicionales del extracto de reseda forman la base del gel. Los componentes de la base del gel pueden estar presentes en relaciones cuantitativas diferentes de las indicadas. Puede comprender otras sustancias y/o sustancias adicionales.

Ejemplo 11

50 *Pomada especial para el tratamiento de estados de sequedad de la piel*

	Extracto de <i>Reseda luteola</i> según el Ejemplo 3	1,0 g
55	Extracto de <i>Calendula officinalis</i> CO2	3,0 g
	Dodecilsulfato sódico	5,0 g
	Triglicéridos de cadena media	5,0 g
60	Monoestearato de glicerol 60	20,0 g
	Cera de carnauba	20,0 g
65	Escualano	25,0 g
	2-octildodecanol	25,0 g

Los componentes adicionales de los extractos vegetales forman la base de la crema. Los componentes de la base de la crema pueden estar presentes en relaciones cuantitativas diferentes de las indicadas. Puede comprender otras sustancias y/o sustancias adicionales.

5 Ejemplo 12

Inducción de apoptosis en células mononucleadas activadas (linfocitos)

Se incubaron células mononucleadas (linfocitos) con disolvente, medio y con extractos de reseda enriquecidos con luteolina, según el Ejemplo 3, en las concentraciones de 1:1000 (100 µg/ml), 1:200 (50 µg/ml), 1:400 (25 µg/ml), 1:800 (12,5 µg/ml), 1:1600 (6,25 µg/ml) y 1:3200 (3,125 µg/ml). En la Figura 5a, el signo "0" indica la ausencia de extracto de reseda. Tras la adición de los aditivos, las células fueron estimuladas con 1 µg/ml de fitohemaglutinina, y se incubaron durante 48 h en la estufa de cultivo. A continuación, se determinó la inducción de apoptosis mediante la medición de los oligonucleosomas (fragmentos de ADN de bajo peso molecular) formados en las células (ELISA de Detección de Muerte Celular). Se demostró un incremento significativo, dependiente de la dosis, del índice de apoptosis por medio de los extractos. La inducción de apoptosis se pudo bloquear con un inhibidor de la caspasa, por lo tanto, está inducida por la caspasa (Figura 5a). En el análisis de los flavonoides aislados presentes en los extractos se puso de manifiesto que la luteolina muestra la acción inductora de apoptosis más intensa (Figura 5b).

20 Ejemplo 13

Acción antioxidante del extracto de reseda

La acción antioxidante relativa del extracto de reseda se determinó de acuerdo con el método TEAC III, en comparación con Trolox y el ácido ascórbico.

- Trolox: 1,0
- Ácido ascórbico: 1,1
- Extracto de reseda: 1,5

El método TEAC III y otros procedimientos aparecen descritos en Böhm V. (2000), *Ernährungsumschau* 47, págs. 372-375.

35 Ejemplo 14

Estimulación de fibroblastos

En un ensayo adicional, se investigó la acción de un extracto de reseda enriquecido con luteolina sobre la proliferación de fibroblastos humanos primarios. Sorprendentemente, se demostró que el extracto a concentraciones muy bajas estimula la proliferación de fibroblastos (Ensayo ViaLight) (Figura 6a), y da lugar a un incremento de la síntesis de colágeno (péptido procolágeno 1 C) (Figura 6b). Se utilizó el extracto de reseda nº 3 =N Res0502.02. Las concentraciones de 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml y 3,125 µg/ml corresponden a las diluciones 1:400, 1:800, 1:1600 0 1:3200, respectivamente. Mientras que en la Figura 6a aparecen indicadas las concentraciones, en la Figura 6b se ofrece la dilución del extracto de reseda. "0" en la Figura 6b significa ausencia de extracto de reseda.

Ejemplo 15

Inhibición de la toxicidad inducida por UV por medio del extracto de reseda

Modelo: Liberación de LDH a partir de fibroblastos humanos primarios

Se irradiaron con 0/50/100 J/cm² de UVA-1 fibroblastos humanos primarios subconfluentes. A continuación, las células se incubaron en medio de cultivo celular, con y sin adición de extracto de reseda (al 0,1%) durante 24 h. En el sobrenadante se midió, entonces, la liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH) (Ensayo enzimático Mira-Cobas). La adición de extracto de reseda a concentraciones bajas inhibe los daños inducidos por UVA-1 de la membrana celular casi por completo. Se utilizó extracto de reseda según el Ejemplo 3 (Res0502.02). La concentración de 0,1% corresponde a una dilución de 1:1000.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para fabricar una composición que contiene flavonoides, que comprende

- a) someter el material de al menos una planta de la familia de las resedáceas a una extracción previa en una solución acuosa,
- b) el residuo de material vegetal que se obtiene en la etapa a) se extrae con un primer disolvente, que es una solución con una fracción de 15 hasta 100% de disolvente orgánico polar en agua, y
- c) se separa al menos una parte del primer disolvente del extracto obtenido en la etapa b), para obtener una composición con un contenido en luteolina de al menos 10%.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se utiliza material de la especie vegetal *Reseda luteola* L.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el primer disolvente es una mezcla de agua/alcohol o de agua/cetona.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque en la etapa c) se lleva a cabo una destilación del extracto que se obtiene en la etapa b).

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque comprende, adicionalmente,

- d) recoger el producto que se obtiene en la etapa c) en un segundo disolvente y, eventualmente, separar los componentes insolubles; y
- e) acidificar, enfriar y/o mezclar con agua la solución obtenida en la etapa d), de manera que se obtiene un sólido.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el producto que se obtiene en la etapa c) se recoge en una solución acuosa con un valor de pH de 6 hasta 10, se separan los componentes insolubles, se ajusta la solución obtenida de esta forma a un valor de pH de 2,5 hasta 6, y se recupera el sólido que se forma.

7. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el producto que se obtiene en la etapa c) se recoge en agua a una temperatura de 30 hasta 100°C, se enfría la solución formada, y se recupera el sólido que se forma.

8. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el producto que se obtiene en la etapa c) se recoge en una mezcla de agua/alcohol o de agua/cetona a una temperatura de 20 hasta 80°C, se agrega agua, y se recupera el sólido que se forma.

9. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el producto que se obtiene en la etapa c) se recoge con una mezcla de agua/alcohol o de agua/cetona, se separan los componentes insolubles, a continuación se agrega agua, y se recupera el sólido que se forma.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 9, **caracterizado** porque el sólido que se obtiene en la etapa e) se recoge con una mezcla de agua/alcohol o de agua/cetona, se separan los componentes insolubles, se agrega agua, y se recupera el sólido que se forma.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el sólido que se obtiene se recoge nuevamente con una mezcla de agua/alcohol o de agua/cetona, se separan los componentes insolubles, se agrega agua, y se recupera el sólido que se forma.

12. Procedimiento para fabricar una composición que contiene flavonoides, con un contenido en luteolina de al menos 10%, que comprende

- a) extraer el material de al menos una planta de la familia de las resedáceas con un primer disolvente, que es una solución con una fracción de 15 hasta 100% de disolvente orgánico polar en agua,
- b) separar al menos una parte del primer disolvente del extracto que se obtiene en la etapa a),
- c) recoger el producto que se obtiene en la etapa b) en un segundo disolvente y, eventualmente, separar los componentes insolubles; y
- d) acidificar, enfriar y/o mezclar con agua la solución que se obtiene en la etapa c), de manera que se obtiene un sólido.

ES 2 305 729 T3

13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque el sólido que se obtiene en la etapa d) se recoge con una mezcla de agua/alcohol de de agua/cetona, se separan los componentes insolubles, se agrega agua, y se recupera el sólido que se forma.

5 14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado** porque el sólido que se obtiene se recoge con una mezcla de agua/alcohol o de agua/cetona, se separan los componentes insolubles, se agrega agua, y se recupera el sólido que se forma.

10 15. Composición que contiene flavonoides, obtenible por un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

16. Extracto vegetal que contiene flavonoides, que contiene al menos 10% de luteolina.

15 17. Uso de una composición según la reivindicación 15, o de un extracto de al menos una planta de la familia de las resedáceas, para fabricar un medicamento para tratar o prevenir la neurodermitis, liquen plano, prurito, psoriasis, pénfigo, penfigoide, dermatitis herpetiforme, esclerodermia, liquen escleroso, dermatitis solar, enfermedad de Favre Racouchaud, queratosis actínicas, elastosis cutánea, acné vulgar, foliculitis simple, rosácea o quemaduras solares, o para estirar y/o alisar la piel, o para prevenir la formación de arrugas y/o el fotoenvejecimiento de la piel.

20 18. Uso según la reivindicación 17, **caracterizado** porque se administra una formulación tópica, que se selecciona del grupo compuesto por pomadas, emulsiones, cremas, pastas, leches, bálsamos, geles, lociones, tinturas, emplastos, polvos, nebulizadores, espumas y composiciones de maquillaje.

25 19. Producto para los cuidados de la piel que contiene una composición según la reivindicación 15, o un extracto de al menos una planta de la familia de las resedáceas.

20. Producto para los cuidados de la piel según la reivindicación 19, **caracterizado** porque contiene, adicionalmente, otro extracto vegetal, que no procede de una planta de la familia de las resedáceas.

30 21. Producto para los cuidados de la piel según la reivindicación 19 ó 20, **caracterizado** porque se selecciona del grupo compuesto por pomadas, emulsiones, cremas, pastas, leches, bálsamos, geles, lociones, tinturas, emplastos, polvos, nebulizadores, espumas y composiciones de maquillaje.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

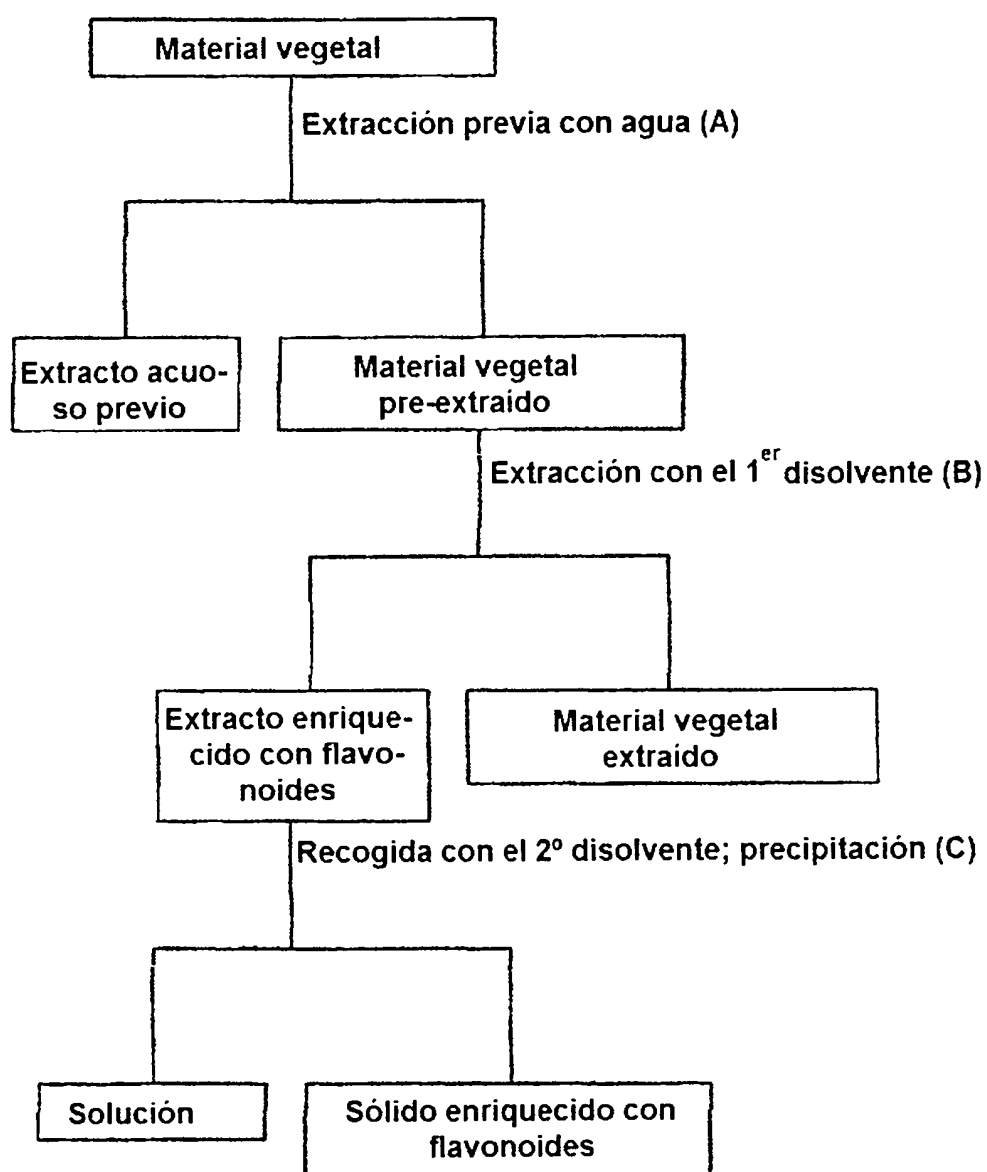


Figura 2

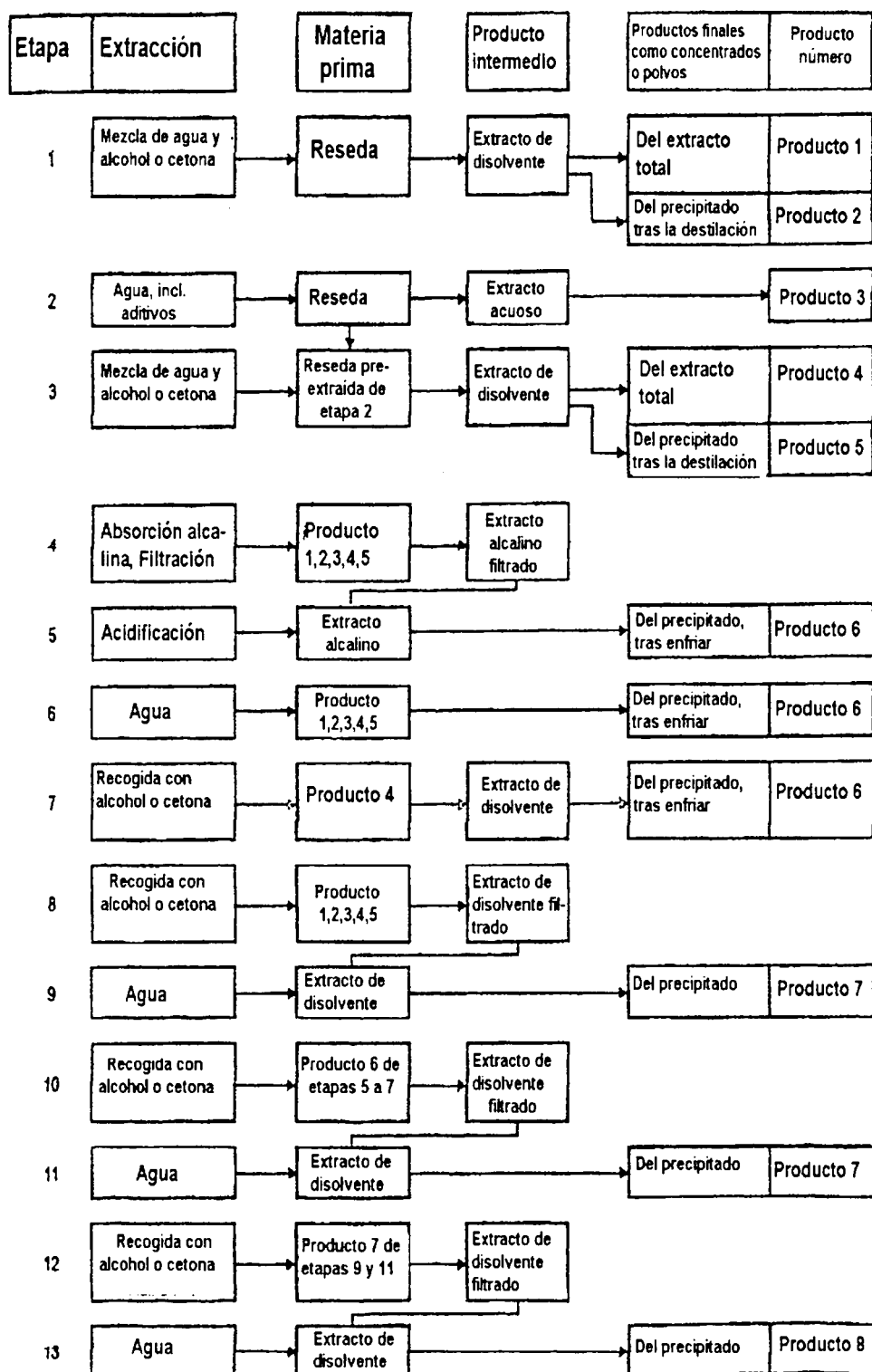


Figura 3a

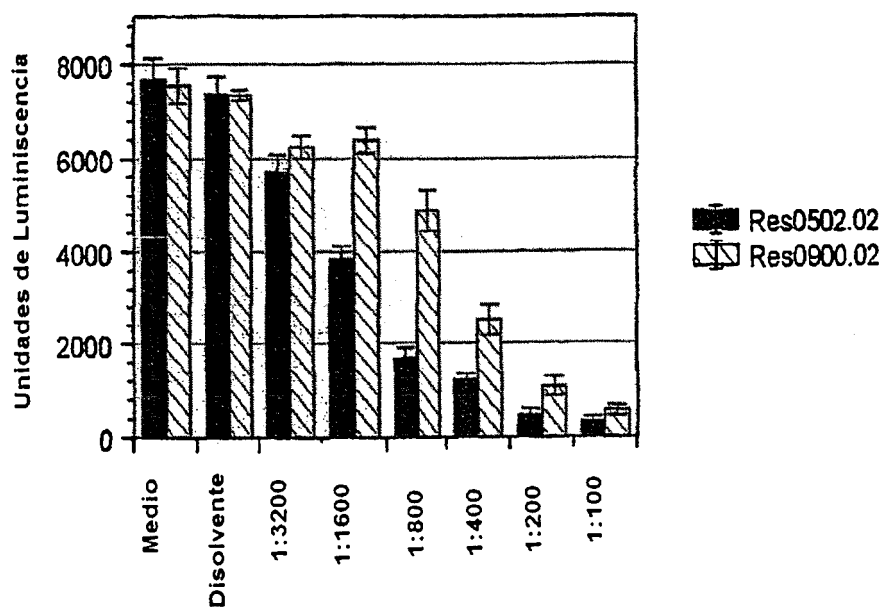


Figura 3b

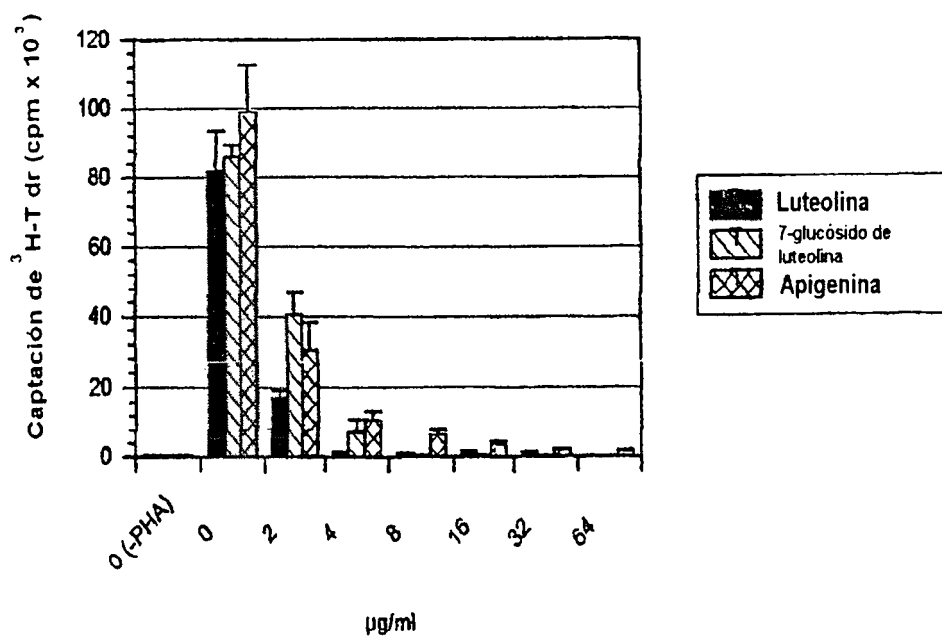


Figura 4

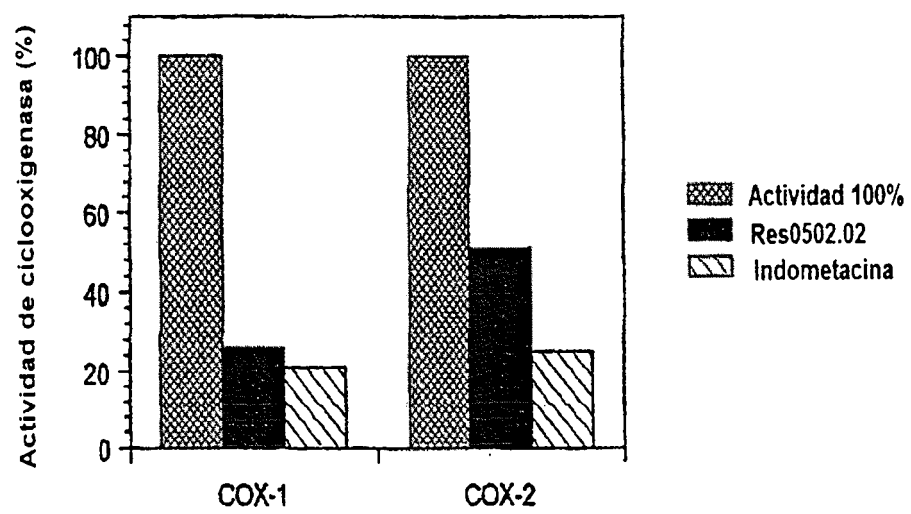


Figura 5a

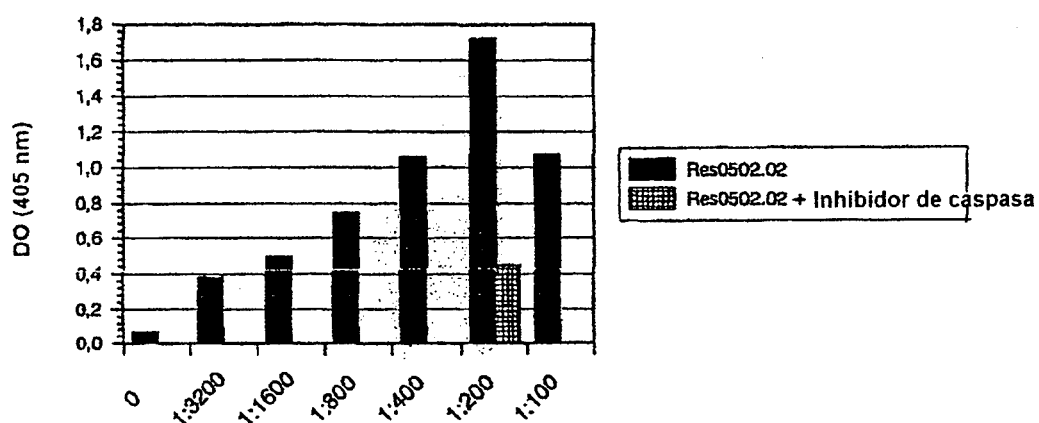


Figura 5b

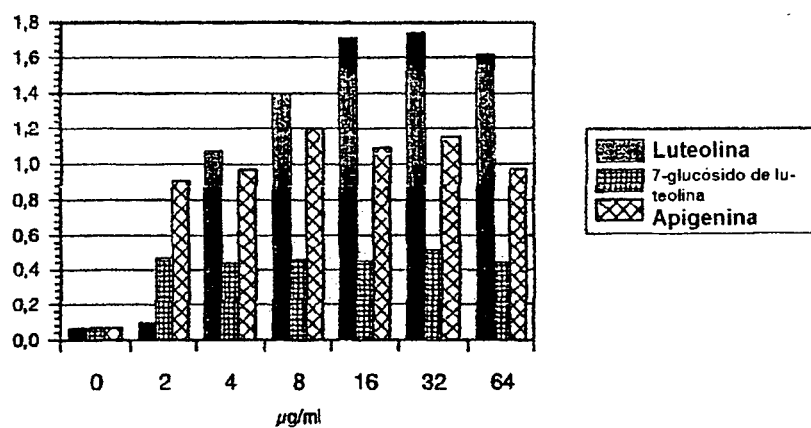


Figura 6a

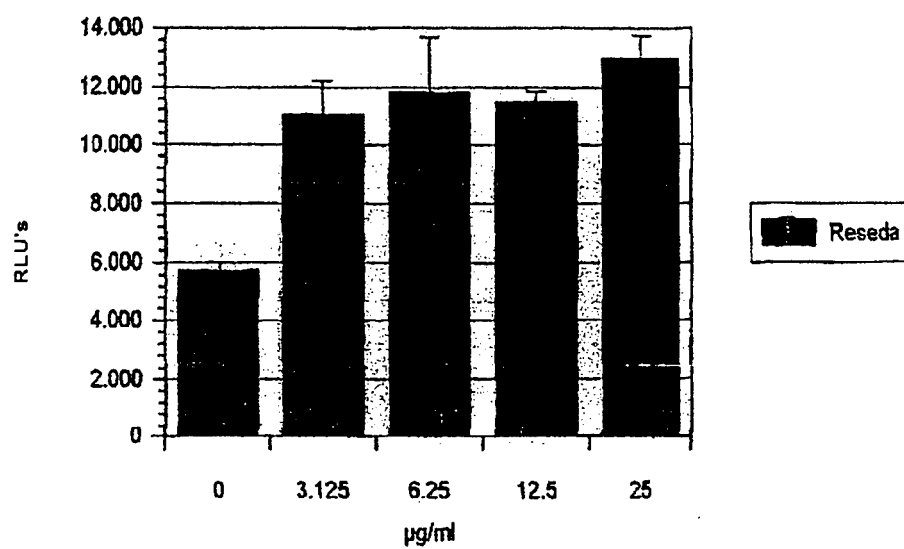


Figura 6b

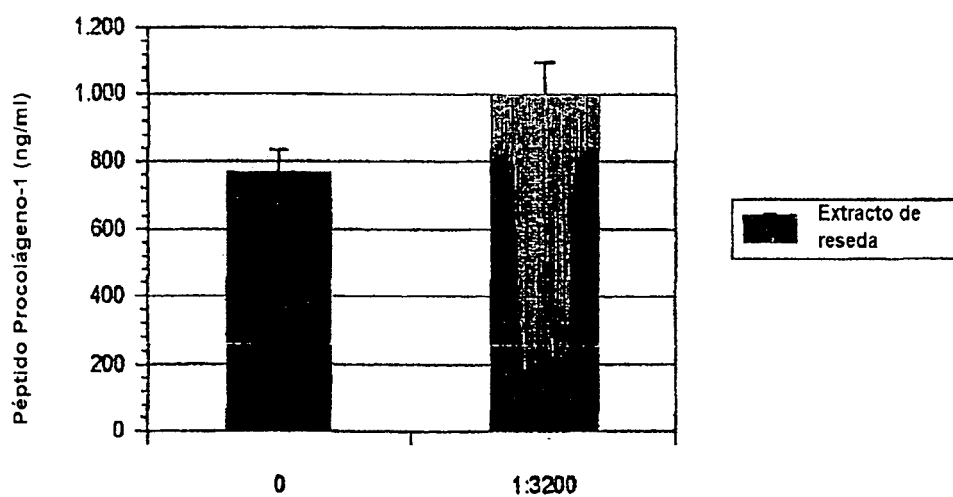


Figura 7

