



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 817 000**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 8/9789** (2007.01)  
**A61K 8/9794** (2007.01)  
**A61Q 19/08** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)  
**A61K 36/21** (2006.01)  
**A61K 36/886** (2006.01)  
**A61K 36/896** (2006.01)  
**C12N 5/04** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2016 PCT/IB2016/000058**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120713**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2016 E 16707196 (8)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3250295**

---

⑮ Título: **Procedimiento de preparación de una composición tópica a base de células vegetales desdiferenciadas e inducidas en cultivo in vitro**

⑩ Prioridad:

**30.01.2015 EP 15000285**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.04.2021**

⑮ Titular/es:

**NAOLYS SARL (100.0%)  
88 route d'Arcachon  
33610 Cestas Pierrotin, FR**

⑮ Inventor/es:

**ENNAMANY, RACHID**

⑮ Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**Observaciones:**

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 817 000 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 de preparación de una composición tópica a base de células vegetales desdiferenciadas e inducidas en cultivo *in vitro*

- 5 La presente solicitud de patente internacional reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea 15 000 285.5 presentada el 30 de enero de 2015 a nombre de ENNAMANY Rachid.
- 10 La invención tiene por objeto una composición de uso tópico, en particular cosmético, rica en metabolitos producidos por células vegetales que proceden de plantas particulares. En particular, la invención tiene por objeto una composición que comprende células vegetales desdiferenciadas e inducidas, secadas después parcialmente o totalmente, preferentemente liofilizadas, y posteriormente dispersadas en esta composición.
- 15 Por células vegetales desdiferenciadas se entiende cualquier célula vegetal que no presenta ninguno de los caracteres de una especialización particular y que es capaz de vivir por sí misma y no en dependencia de otras células.
- 20 Las células vegetales desdiferenciadas se pueden obtener a partir de material vegetal procedente de una planta entera o de una parte de la planta tal como las hojas, los tallos, las flores, los pétalos, las raíces, los frutos, su piel, la cascarilla que los protege, las semillas, las anteras, la savia, las espinas, las yemas, la corteza, las bayas y mezclas de los mismos.
- 25 Preferentemente, las células vegetales desdiferenciadas se obtienen a partir de la corteza, las hojas, las yemas y la piel de los frutos.
- 30 Las células vegetales desdiferenciadas que se pueden usar de acuerdo con la invención se pueden obtener a partir de plantas obtenidas mediante cultivo *in vivo* o procedentes de un cultivo *in vitro*.
- 35 Por cultivo *in vivo* se entiende cualquier cultivo de tipo convencional, es decir, en el suelo al aire libre o en un invernadero o, incluso, fuera del suelo o en medio hidropónico.
- 40 Por cultivo *in vitro* se entiende el conjunto de técnicas conocidas por el experto en la técnica que permiten obtener de manera artificial una planta o de una parte de una planta. La presión de selección impuesta por las condiciones físico-químicas durante el crecimiento de las células vegetales *in vitro* permite obtener un material vegetal estandarizado, sin contaminaciones y disponible durante todo el año al contrario que las plantas cultivadas *in vivo*.
- 45 Preferentemente, de acuerdo con la invención se usan células vegetales desdiferenciadas procedentes de un cultivo *in vitro*.
- 50 Las células vegetales desdiferenciadas que se pueden usar de acuerdo con la invención se pueden obtener por cualquier método conocido de la técnica anterior. A este respecto se pueden citar los métodos descritos por E.F. George y P.D. Sherrington en "Plant Propagation by tissue culture, handbook and directory of commercial laboratories" (Exegetics Ltd 1984).
- 55 Los medios de cultivo que se pueden usar de acuerdo con la invención son los conocidos normalmente por el experto en la técnica. Se pueden citar a modo de ejemplo los medios de Gamborg, Murashige y Skoog, Heller, White etc. Se pueden encontrar descripciones completas de estos medios en "Plant Culture Média: formulations and uses" de E.F. George, DJM Puttock y H.J George (Exegetics Ltd 1987, tomo 1 & 2).
- 60 Preferentemente de acuerdo con la invención, se preparan las células vegetales desdiferenciadas cultivadas en el medio de Murashige y Skoog.
- 65 **Estado de la técnica**
- 50 Del documento FR 2795637 se conoce una composición cosmética que contiene un extracto de células vegetales desdiferenciadas para evitar los problemas de olor. Esta composición contiene un extracto de células vegetales desdiferenciadas pero no inducidas, de modo que esta composición tiene pocos metabolitos secundarios o fitoalexinas, incluso carece esencialmente de tales compuestos. Asimismo, este documento describe el uso de los extractos acuosos obtenidos mediante trituración de las células en su medio de cultivo y eliminación posterior de las partículas en suspensión con una pérdida inevitable de los metabolitos unidos a las partículas en suspensión. A fin de eliminar las proteasas y, en particular, las oxidases, este documento recomienda igualmente la utilización de filtros que atrapan las moléculas con un peso molecular superior a 100 000 daltons perdiendo así el extracto final todos los metabolitos superiores a ese peso y que puede ser de gran interés para la industria cosmética. A fin de eliminar los problemas debidos a la oxidación, el documento recomienda añadir estabilizantes, particularmente cisteína y/o derivados de azufre, lo que lleva necesariamente a una menor pureza del extracto con etapas posteriores de filtración. Los métodos descritos en este documento requieren el uso de medios complicados para la obtención de extractos cuya pureza (numerosos aditivos), calidad y concentración (de metabolitos) no son óptimas. Además, las numerosas etapas necesarias para la obtención de los extractos de este procedimiento conducen a costes elevados y al riesgo de contaminaciones por la gran cantidad de manipulaciones y aditivos.

Son conocidos los cultivos de células desdiferenciadas; por otro lado se conocen los mecanismos de inducción de estas células después de etapas de extracción y de filtración diversas seguidas de una liofilización a fin de incorporar los extractos obtenidos en una preparación cosmética o farmacéutica. Tales procedimientos se describen, por ejemplo, en los documentos US 4 241 536, EP 378 921, WO 88/00968, EP 1 203 811, etc., para diversas especies de plantas. El contenido de estos documentos se incorpora en la presente descripción por referencia para describir medios de cultivo, especies de plantas, inductores posibles, etc.

5 Hoy en día, a pesar de las competencias y los conocimientos de las industrias en el campo de la extracción vegetal y a pesar de los progresos de la química orgánica, son indispensables varias etapas de extracción para obtener una 10 materia prima vegetal.

Se achacan varios inconvenientes a estas extracciones:

- 15
- pérdida de la estructura terciaria de las moléculas aisladas,
  - presencia de diferentes disolventes en el producto final,
  - heterogeneidad de los sustratos que requieren extracciones finas que usan disolventes cada vez más tóxicos,
  - calidad del extracto en función del estado fisiológico de la planta en el momento de la recolección,
  - producción del extracto limitada en función de las estaciones,

20 Ante estos factores limitantes y el interés renovado de los consumidores por todo aquello de origen natural, se han efectuado numerosas tentativas para la obtención de células. Así, actualmente se han desarrollado dos procedimientos principales:

- 25
- El cultivo de células a partir de organismos unicelulares o de microorganismos, técnica poco original que se basa en la reproducción de las condiciones de vida normales. Estos organismos, sin embargo, son primitivos y no desarrollan un metabolismo secundario, que es la fuente de los principios activos más interesantes.
  - La obtención de células a partir de frutos (células frescas) tras una digestión enzimática. Las limitaciones de este procedimiento se basan en el hecho de que los frutos no son asépticos y pueden contener residuos de plaguicidas (fungicidas, herbicidas, insecticidas...). Por otra parte, las enzimas (celulasas, pectinasas...) usadas 30 en una cantidad elevada (2 % p/p) para la digestión de las paredes vegetales y la obtención de células sin pared (protoplastos) están presentes en el producto final. Asimismo, las enzimas usadas pueden alterar la calidad de los metabolitos. Por último, el empleo de esta técnica permite recuperar solamente protoplastos (células sin pared celular), estructuras frágiles que no pueden dirigir su metabolismo.

35 Del documento WO 03/077880 se conoce también un procedimiento de preparación de un material triturado de células desdiferenciadas e inducidas para producir fitoalexinas. En este documento, las células vegetales se seleccionan a partir de familias particulares y se inducen de acuerdo con etapas particulares.

40 El documento " Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review", MATKOWSKI A., *Biotechnology Advances* 26(2008) 548-560 describe un procedimiento de cultivo *in vitro* para la producción de antioxidantes. Según este documento, existen diversas estrategias para aumentar la producción de metabolitos, a saber, las condiciones de cultivo, con la irradiación como factor que favorece la biosíntesis; la selección de células muy productivas; la inducción y el estrés (véase la pagina 556: "La irradiación con UV se ha usado también para hacer que las células vegetales sinteticen más antioxidantes... La irradiación estimuló un gran incremento de la cantidad de flavonoides..."). 45 En su conclusión, este documento indica: "A pesar de la inmensa variedad de compuestos antioxidantes obtenidos a partir de plantas cultivadas *in vitro*, sus células, tejidos y órganos, no se pueden mencionar muchos ejemplos de tecnologías aplicables en la práctica...".

50 El documento "Induction of flavanoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures", Antagoni F. et al., *Fitoterapia* 78(207) 345 - 352, enseña la producción de flavonoides mediante radiación UV-B en cultivos de *Passiflora quadrangularis*. Asimismo, en la página 346 se estipula que "Desgraciadamente el rendimiento del producto final deseado es a menudo demasiado bajo como para hacer viable esta alternativa a la extracción de plantas cultivadas en el campo. Por consiguiente, se han emprendido muchos estudios para descifrar las rutas biosintéticas y comprender su regulación...".

55 Los inventores han descubierto ahora que sometiendo células desdiferenciadas de familias de plantas particulares a un ciclo de inducción particular, es posible obtener células que contienen una mezcla de moléculas en proporciones relativas entre ellas que permiten asegurar un tratamiento adecuado de problemas asociados a la piel.

60 En la presente memoria, por luminosidad se entiende una iluminación con rayos con una longitud de onda comprendida entre 100 nm y 700 nm, en particular en el espectro visible y, preferentemente, en el intervalo de 400 nm a 520 nm (correspondiente al espectro de color azul y verde). Durante las etapas de iluminación, de forma ventajosa la iluminación no comprende rayos con una longitud de onda inferior a 100 nm y/o superior a 700 nm. Preferentemente, más de un 90 % de los rayos, en particular más de un 95 % de los rayos, tienen una longitud de onda comprendida entre 100 nm y 700 nm, preferentemente comprendida entre 400 nm y 520 nm.

En la presente memoria, los periodos de no luminosidad son ventajosamente periodos en los que el medio de cultivo no está sometido esencialmente a un rayo con una longitud de onda comprendida entre 100 nm y 700 nm, sino también preferentemente inferior a 100 nm y superior a 700 nm. Los periodos de no luminosidad son preferentemente periodos de oscuridad total o casi total.

La invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de una composición de uso tópico tal como se reivindica en el reivindicación 1, estando caracterizado dicho procedimiento esencialmente por que se ponen células vegetales desdiferenciadas de una especie seleccionada entre el grupo de especies de las familias siguientes:

- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Agavaceae (en particular las especies: *Agave*, *Beschorneria*, *Chlorophytum*, *Furcraea*, *Hesperaloe*, *Hesperoyucca*, *Yucca*), Amaryllidaceae (en particular la especie: *Boophane*, *Brunsvigia*, *Cyrtanthus*, *Haemanthus*, *Rauhia*), Anacardiaceae (en particular la especie: *Operculicarya*, *Pachycormus*), Apiaceae (en particular la especie: *Steganotaenia*), Apocynaceae (en particular la especie: *Adenium*, *Mandevilla*, *Pachypodium*, *Plumeria*), Araceae (en particular las especies: *Zamioculcas zamiifolia*); Araliaceae (en particular las especies: *Cussonia*), Asclepiadaceae (en particular las especies: *Absolmsia*, *Asclepias*, *Aspidoglossum*, *Aspidonepysis*, *Baynesia*, *Brachystelma*, *Caralluma*, *Ceropegia*, *Cibirhiza*, *Cynanchum*, *Dischidia*, *Dischidiopsis*, *Duvalia*, *Duvaliandra*, *Echidnopsis*, *Edithcolea*, *Fanninia*, *Fockea*, *Glossostelma*, *Hoodia*, *Huernia*, *Huerniopsis*, *Ischnolepis*, *Larryleachia*, *Lavrania*, *Madangia*, *Marsdenia*, *Matelea*, *Micholitzia*, *Miraglossum*, *Notechidnopsis*, *Odontostelma*, *Ophionella*, *Orbea*, *Orbeanthus*, *Pachycarpus*, *Pectinaria*, *Petopentia*, *Piaranthus*, *Pseudolithos*, *Quaqua*, *Raphionacme*, *Rhytidocaulon*, *Riocreuxia*, *Sarcorrhiza*, *Sarcostemma*, *Schizoglossum*, *Schlechterella*, *Stapelia*, *Stapelianthus*, *Stapeliopsis*, *Stathmostelma*, *Stenostelma*, *Stomatostemma*, *Tavaresia*, *Trachycalymma*, *Tridente*, *Tromotriche*, *White-sloanea*, *Xysmalobium*), Asparagaceae (en particular las especies: *Myrsiphyllum*), Asphodelaceae ((en particular las especies: *Aloe*, *Astroloba*, *Bulbine*, *Chortolirion*, *Gasteria*, *Haworthia*, *Poellnitzia*, *Trachyandra*), Asteraceae (en particular las especies: *Baeriopsis*, *Coulterella*, *Crassocephalum*, *Didelta*, *Gynura*, *Osteospermum*, *Othonna*, *Polyachyrus*, *Pteronia*, *Senecio*), Balsaminaceae (en particular las especies: *Impatiens*), Basellaceae (en particular las especies: *Anredera*, *Basella*), Begoniaceae (en particular las especies: *Begonia*), Bombacaceae (en particular las especies: *Adansonia*, *Cavanillesia*, *Ceiba*, *Pseudobombax*), Brassicaceae (en particular las especies: *Heliphila*, *Lepidium*), Bromeliaceae, Burseraceae (en particular las especies: *Beiselia*, *Bursea*, *Commiphora*), Cactaceae (en particular las especies: *Acanthocalycium*, *Acanthocereus*, *Ariocarpus*, *Armatocereus*, *Arrojadoa*, *Arthrocereus*, *Astrophytum*, *Astrocactus*, *Aztekium*, *Bergerocactus*, *Blossfeldia*, *Brachycereus*, *Browningia*, *Brasilicereus*, *Calymmanthium*, *Carnegiea*, *Cephalocereus*, *Cephalocleistocactus*, *Cereus*, *Cintia*, *Cipocereus*, *Cleistocactus*, *Coleocephalocereus*, *Copiapoa*, *Corycactus*, *Coryphantha*, *Dendrocereus*, *Denmoza*, *Discocactus*, *Disocactus*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Echinopsis*, *Epiphyllum*, *Epithelantha*, *Eriosyce*, *Escobaria*, *Escontria*, *Epostoia*, *Epostoopsis*, *Eulychnia*, *Facheiroa*, *Ferocactus*, *Frailea*, *Geohintonia*, *Gymnocalycium*, *Haageocereus*, *Harrisia*, *Hatiora*, *Hylocereus*, *Jasminocereus*, *Lasiocereus*, *Leocereus*, *Lepismium*, *Leptocereus*, *Leuchtenbergia*, *Lophophora*, *Maihuenia*, *Malacocarpus*, *Mammillaria*, *Mammillloydia*, *Matucana*, *Melocactus*, *Micranthocereus*, *Mila*, *Monvillea*, *Myrtillocactus*, *Neobuxbaumia*, *Neolloydia*, *Neoraimondia*, *Neowerdermannia*, *Obregonia*, *Opuntia*, *Oreocereus*, *Oroya*, *Ortegocactus*, *Pachycereus*, *Parodia*, *Pediocactus*, *Pelecyphora*, *Peniocereus*, *Pereskia*, *Pereskiopsis*, *Pilosocereus*, *Polaskia*, *Praecereus*, *Pseudoeanthocereus*, *Pseudorhipsalis*, *Pterocactus*, *Pygmaeocereus*, *Quiabentia*, *Rauhocereus*, *Rebutia*, *Rhipsalis*, *Samaipaticereus*, *Schlumbergera*, *Sclerocactus*, *Selenicereus*, *Stenocactus*, *Stenocereus*, *Stephanocereus*, *Stetsonia*, *Strombocactus*, *Tacinga*, *Thelocactus*, *Turbinicarpus*, *Uebelmannia*, *Weberbauercereus*, *Weberocereus*, *Yungasocereus*), Campanulaceae (en particular las especies: *Brighamia*), Capparidaceae (en particular las especies: *Maerua*), Caricaceae (en particular las especies: *Carica*, *Jacarathia*), Chenopodiaceae, Cochlospermaceae, Commelinaceae (en particular las especies: *Aneilema*, *Callisia*, *Cyanotis*, *Tradescantia*, *Tripogandra*), Convolvulaceae (en particular las especies: *Ipomea*, *Sictocardia*, *Turbina*), Crassulaceae (en particular las especies: *Adromischus*, *Aeonium*, *Afrovivella*, *Aichryson*, *Cotyledon*, *Crassula*, *Cremnophila*, *Cremnosedum*, *Dudleya*, *Echeveria*, *Graptopetalum*, *Hylotelephium*, *Hypagophytum*, *Kalanchoe*, *Lenophyllum*, *Meterostachys*, *Monanthes*, *Orostachys*, *Pachyphytum*, *Perrierosedum*, *Phedimus*, *Pistorinia*, *Prometheum*, *Pseudosedum*, *Rhodiola*, *Rosularia*, *Sedella*, *Sedum*, *Sempervivum*, *Sinocrassula*, *Thompsonella*, *Tylecodon*, *Umbilicus*, *Villadia*), Cucurbitaceae (en particular las especies: *Apodanthera*, *Brandegea*, *Cephalopentandra*, *Ceratosanthes*, *Citrullus*, *Coccinia*, *Corallocarpus*, *Cucumella*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cyclantheropsis*, *Dendrosicyos*, *Doyeria*, *Eureindra*, *Fevillea*, *Gerrandanthus*, *Gynostemma*, *Halosicyos*, *Ibervillea*, *Kedostris*, *Marah*, *Momordica*, *Nealsomitra*, *Odosicyos*, *Parasicyos*, *Syrigia*, *Telfairia*, *Trochomeria*, *Trochomeriopsis*, *Tumamoca*, *Xerosicyos*, *Zehneria*, *Zygosicyos*), Didiereaceae (en particular las especies: *Alluaudia*, *Alluaudiopsis*, *Decaria*, *Didieara*), Dioscoreaceae (en particular las especies: *Dioscorea*), Ericaceae (en particular las especies: *Sphyrospermum*), Eriospermaceae (en particular las especies: *Eriospermum*), Euphorbiaceae, Fabaceae (en particular las especies: *Delonix*, *Dolichos*, *Erythrina*, *Neorautanenia*, *Pachyrhizus*, *Tylosema*), Fouquieriaceae (en particular las especies: *Fouquieria*), Geraniaceae (en particular las especies: *Monsonia*, *Pelargonium*), Gesneriaceae (en particular las especies: *Aeschynanthus*, *Alsobia*, *Chirita*, *Codonanthe*, *Columnea*, *Nematanthus*, *Sinningia*, *Streptocarpus*), Hyacinthaceae (en particular las especies: *Albuca*, *Bowiea*, *Dipcadi*, *Drimia*, *Drimiopsis*, *Hyacinthus*, *Lachenalia*, *Ledebouria*, *Litanthus*, *Massonia*, *Ornithogalum*, *Rhadamanthus*, *Rhodocodon*, *Schizobasis*, *Whiteheadia*), Icacinaceae (en particular las especies: *Pyrenacantha*), Lamiaceae (en particular las especies: *Aeollanthus*, *Dauphinea*, *Perrierastrum*, *Plectranthus*, *Solenostemon*, *Tetradenia*, *Thornicroftia*), Lintulariaceae, Loasaceae (en particular las especies: *Schismocarpus*), Loranthaceae (en particular las especies: *Tapinanthus*), Melastomataceae (en particular las especies: *Medinilla*), Meliaceae (en particular las especies: *Entandrophragma*), Menispermaceae (en particular las especies: *Chasmanthera*, *Stephania*,

*Tinospora), Moraceae (en particular las especies: *Dorstenia, Ficus*), Nolanaceae (en particular las especies: *Nolana*), Nolinaceae (en particular las especies: *Beaucarnea, Calibanus, Dasylirion, Nolina*), Orchidaceae, Oxalidaceae (en particular las especies: *Oxalis*), Passifloraceae (en particular las especies: *Adenia*), Pedaliaceae (en particular las especies: *Pterodiscus, Sesamothamnus, Uncarina*), Phyllanthaceae (en particular las especies: *Phyllanthus*), 5 Phytolaccaceae (en particular las especies: *Phytolacca*), Piperaceae (en particular las especies: *Peperomia*), Portulacaceae (en particular las especies: *Amphipetalum, Anacampseros, Avonia, Calyptrotheca, Ceraria, Cistanthe, Dendroportulaca, Grahamia, Lewisia, Parakeelya, Portulaca, Portulacaria, Schreiteria, Talinella, Talinum*), Rubiaceae (en particular las especies: *Anthorrhiza, Hydnophytum, Hydrophylax, Myrmecodia, Myrmephytum, Phylohydrax, Squamellaria*), Ruscaceae (en particular las especies: *Cordyline, Dracaena, Sansevieria*), Sapindaceae (en particular las especies: *Erythrophysa*), Saxifragaceae, Sterculiaceae (en particular las especies: *Brachychiton, Sterculia*), 10 Urticaceae (en particular las especies: *Laportea, Obertia, Pilea, Sarcopilea*), Viscaceae (en particular las especies: *Viscum*), Vitaceae (en particular las especies: *Cissus, Cyphostemma*), Xanthorrhoeaceae y Zygophyllaceae, en un medio de cultivo *in vitro* para permitir el crecimiento de las células, al mismo tiempo que su inducción, llevando a cabo dichos crecimiento e inducción en el medio *in vitro* en una atmósfera gaseosa que consiste en aire húmedo 15 enriquecido con CO<sub>2</sub> con un contenido de un 1 a un 5 % en volumen de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa de más del 50 %, a una temperatura comprendida entre 15 °C y 50 °C de acuerdo con un ciclo que comprende 10 períodos de oscuridad o de baja luminosidad con una luminosidad de menos de 10 lux (en particular de 1 a 5 lux) durante 20 minutos y 3 horas, estando separados los períodos de oscuridad entre sí por un periodo de luminosidad en el intervalo de 100 nm a 700 nm, preferentemente de 400 nm a 520 nm, de más de 1000 lux durante un periodo de 1 a 20 6 horas (más específicamente de más de 10 000 lux, preferentemente de más de 50 000 lux e, incluso más preferentemente, de más de 100 000 lux) y por que se cultivan y se inducen dichas células vegetales desdiferenciadas en el medio de cultivo *in vitro* durante un ciclo suficientemente largo para la síntesis de una cantidad suficiente de metabolitos en las células desdiferenciadas, por que se separan, al menos parcialmente, las 25 células del medio de cultivo y por que se mezclan las células vegetales inducidas del medio de cultivo con uno o varios excipientes aceptables para aplicación tópica a fin de preparar una composición tópica, ventajosamente cosmética, de acuerdo con la invención.*

De acuerdo con el procedimiento, la atmósfera es de aire enriquecido con CO<sub>2</sub> y humedad si es necesario.

30 En formas de realización ventajosas del procedimiento de acuerdo con la invención, las células se prepararon ventajosamente empleando una o varias de las características siguientes:

- el cambio de luminosidad durante el paso de un periodo de luminosidad de menos de 10 lux a un periodo de luminosidad de más de 1000 lux (ventajosamente de más de 50 000 lux) se efectúa en un tiempo de menos de 2 35 minutos.
- las células se cultivan en primer lugar para obtener células desdiferenciadas y las células desdiferenciadas así obtenidas se ponen un medio de cultivo *in vitro* para su desarrollo con inducción.

40 El interés de este procedimiento es que permite obtener células vegetales ricas en moléculas particulares (de la familia de los estilbenos, flavonoides, neobetanina, alcaloides, vitaminas, queracetina-3-metil éter, ácidos grasos, derivados de rutina o rutinósido, ácido gálico, isorhamnetina, etc.) en las proporciones adecuadas en grandes volúmenes respondiendo al mismo tiempo a las necesidades de la industria, específicamente:

- el respeto de la estructura terciaria de las moléculas,
- la ausencia de disolvente y de residuos,
- la homogeneidad de los sustratos,
- la producción continua independientemente del ciclo de las estaciones,
- la conservación de las características biológicas y fisiológicas sin añadir conservantes,
- la ausencia total de contaminantes,
- la producción estandarizada y reproducible en cuanto a la calidad y la concentración de los metabolitos,
- el uso de estas suspensiones vegetales después de la liofilización directa empleando una temperatura inferior a - 30 °C. Esta técnica permite obtener un polvo muy fino que se puede dispersar en composiciones cosméticas (cremas, pomadas, lociones...). Estas células pueden liberar directamente los principios activos que contienen, sin pasar por una extracción con disolventes orgánicos (eliminación del riesgo de residuos).
- el uso de extractos celulares únicamente después de los ultrasonidos y la centrifugación.
- el uso de células vegetales desdiferenciadas e inducidas frescas, no trituradas, mezcladas con un excipiente cosmético (por ejemplo glicerina, uno o varios glicoles, uno o varios aceites). Las células frescas se aíslan ventajosamente del medio de cultivo, se lavan y opcionalmente se enjuagan, antes de secarlas opcionalmente, antes de mezclarlas con uno o varios excipientes para aplicación cosmética.

60 Esta tecnología aporta una alternativa útil e innovadora a las extracciones convencionales con disolventes. La posibilidad de dirigir de manera natural (inducción) la síntesis de metabolitos sin que afecte a la integridad genética de las células representa una garantía de calidad y de autenticidad.

65 De manera totalmente sorprendente, los inventores han descubierto que se podían incorporar o dispersar directamente las células después de la inducción y el secado en una composición cosmética y/o farmacéutica. La

composición de acuerdo con la invención contiene, por tanto, materia de las membranas celulares. Este procedimiento presenta específicamente la ventaja de desactivar las enzimas oxidantes sin añadir aditivos o productos químicos. Otro aspecto de la invención permite concentrar y dirigir la producción de las fitoalexinas sin pérdidas cuantitativas o cualitativas debidas a las extracciones y a las filtraciones.

5 Por composición de uso tópico se entienden cremas, ungüentos, lociones, suspensiones, barras, champús, geles, sueros, leches, lociones, cremas, soluciones (por ejemplo aplicables con pulverizador). La composición de uso tópico es, por ejemplo, una composición cosmética, dermatológica, una composición de higiene para la piel, un perfume, etc.

10 Preferentemente, de acuerdo con la invención, la composición es una composición cosmética.

Los ejemplos y composiciones siguientes ilustran la invención sin limitarla de ningún modo. En las composiciones, las proporciones indicadas son porcentajes en peso.

15 En estos ejemplos, se emplea un procedimiento preferente tal como el definido concretamente con anterioridad.

Etapa 1: Preparación de células desdiferenciadas y cultivadas en un medio de cultivo *in vitro*

20 Esta etapa de preparación de células desdiferenciadas se ha efectuado de manera convencional. Para esta etapa se han usado células vegetales procedentes de plantas que pertenecen a las familias siguientes:

Agavaceae (en particular las especies: *Agave*, *Beschorneria*, *Chlorophytum*, *Furcraea*, *Hesperaloe*, *Hesperoyucca*, *Yucca*), Amaryllidaceae (en particular la especie: *Boophane*, *Brunsvigia*, *Cyrtanthus*, *Haemanthus*, *Rauhia*),

25 Anacardiaceae (en particular la especie: *Operculicarya*, *Pachycormus*), Apiaceae (en particular la especie: *Steganotaenia*), Apocynaceae (en particular la especie: *Adenium*, *Mandevilla*, *Pachypodium*, *Plumeria*), Araceae (en particular las especies: *Zamioculcas zamiifolia*); Araliaceae (en particular las especies: *Cussonia*), Asclepiadaceae (en particular las especies: *Absolmsia*, *Asclepias*, *Aspidoglossum*, *Aspidonepysis*, *Baynesia*, *Brachystelma*, *Caralluma*, *Ceropegia*, *Cibirhiza*, *Cynanchum*, *Dischidia*, *Dischidiopsis*, *Duvalia*, *Duvaliandra*, *Echidnopsis*, *Edithcolea*, *Fanninia*, *Fockea*, *Glossostelma*, *Hoodia*, *Hoya*, *Huernia*, *Huerniopsis*, *Ischnolepis*, *Larryleachia*, *Lavrania*, *Madangia*, *Marsdenia*, *Matelea*, *Micholitzia*, *Miraglossum*, *Notechidnopsis*, *Odontostelma*, *Ophionella*, *Orbea*, *Orbeanthus*, *Pachycarpus*, *Pectinaria*, *Petopentia*, *Piaranthus*, *Pseudolithos*, *Quaqua*, *Raphionacme*, *Rhytidocaulon*, *Riocreuxia*, *Sarcorrhiza*, *Sarcostemma*, *Schizoglossum*, *Schlechterella*, *Stapelia*, *Stapelianthus*, *Stapeliopsis*, *Stathmostelma*, *Stenostelma*, *Stomatostemma*, *Tavaresia*, *Trachycalymma*, *Tridente*, *Tromotriche*, *White-sloanea*, *Xysmalobium*), Asparagaceae (en particular las especies: *Myrsiphyllum*), Asphodelaceae ((en particular las especies: *Aloe*, *Astroloba*, *Bulbine*, *Chortolirion*, *Gasteria*, *Haworthia*, *Poellnitzia*, *Trachyandra*), Asteraceae (en particular las especies: *Baeriopsis*, *Coulterella*, *Crassocephalum*, *Didelta*, *Gynura*, *Osteospermum*, *Othonna*, *Polyachyrus*, *Pteronia*, *Senecio*), Balsaminaceae (en particular las especies: *Impatiens*), Basellaceae (en particular las especies: *Anredera*, *Basella*), Begoniaceae (en particular las especies: *Begonia*), Bombacaceae (en particular las especies: *Adansonia*, *Cavanillesia*, *Ceiba*, *Pseudobombax*), Brassicaceae (en particular las especies: *Heliphila*, *Lepidium*), Bromeliaceae, Burseraceae (en particular las especies: *Beiselia*, *Bursea*, *Commiphora*), Cactaceae (en particular las especies: *Acanthocalycium*, *Acanthocereus*, *Ariocarpus*, *Armatocereus*, *Arrojadoa*, *Arthrocereus*, *Astrophytum*, *Astrocactus*, *Aztekium*, *Bergerocactus*, *Blossfeldia*, *Brachycereus*, *Browningia*, *Basilicereus*, *Calymmanthium*, *Carnegiea*, *Cephalocereus*, *Cephalocleistocactus*, *Cereus*, *Cintia*, *Cipocereus*, *Cleistocactus*, *Coleocephalocereus*, *Copiapoa*, *Corynocactus*, *Coryphantha*, *Dendrocereus*, *Denmoza*, *Discocactus*, *Discocactus*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Echinopsis*, *Epiphyllum*, *Epithelantha*, *Eriosyce*, *Escobaria*, *Escontria*, *Epostoa*, *Epostoopsis*, *Eulychnia*, *Facheiroa*, *Ferocactus*, *Frailea*, *Geohintonia*, *Gymnocalycium*, *Haageocereus*, *Harrisia*, *Hatiiora*, *Hylocereus*, *Jasminocereus*, *Lasiocereus*, *Leocereus*, *Lepismium*, *Leptocereus*, *Leuchtenbergia*, *Lophophora*, *Maihuenia*, *Malacocarpus*, *Mammillaria*, *Mammillloydia*, *Matucana*, *Melocactus*, *Micranthocereus*, *Mila*, *Monvillea*, *Myrtillocactus*, *Neobuxbaumia*, *Neolloydia*, *Neoraimondia*, *Neowerdermannia*, *Obregonia*, *Opuntia*, *Oreocereus*, *Oroya*, *Ortegocactus*, *Pachycereus*, *Parodia*, *Pediocactus*, *Pelecyphora*, *Peniocereus*, *Pereskia*, *Pereskia*, *Pilosocereus*, *Polaskia*, *Praecereus*, *Pseudoeanthocereus*, *Pseudorhipsalis*, *Pterocactus*, *Pygmaeocereus*, *Quiabentia*, *Rauhocereus*, *Rebutia*, *Rhipsalis*, *Samaipaticereus*, *Schlumbergera*, *Sclerocactus*, *Selenicereus*, *Stenocactus*, *Stenocereus*, *Stephanocereus*, *Stetsonia*, *Strombocactus*, *Tacinga*, *Thelocactus*, *Turbinicarpus*, *Uebelmannia*, *Weberbauerocereus*, *Weberocereus*, *Yungasocereus*), Campanulaceae (en particular las especies: *Brighamia*), Capparidaceae (en particular las especies: *Maerua*), Caricaceae (en particular las especies: *Carica*, *Jacarathia*), Chenopodiaceae, Cochlospermaceae, Commelinaceae (en particular las especies: *Aneilema*, *Callisia*, *Cyanotis*, *Tradescantia*, *Tripogandra*), Convolvulaceae (en particular las especies: *Ipomea*, *Sictocardia*, *Turbina*), Crassulaceae (en particular las especies: *Adromischus*, *Aeonium*, *Afrovivella*, *Aichryson*, *Cotyledon*, *Crassula*, *Cremnophila*, *Cremnosedum*, *Dudleya*, *Echeveria*, *Graptopetalum*, *Hylotelephium*, *Hypagophytum*, *Kalanchoe*, *Lenophyllum*, *Meterostachys*, *Monanthes*, *Orostachys*, *Pachyphytum*, *Perrierosedum*, *Phedimus*, *Pistorinia*, *Prometheum*, *Pseudosedum*, *Rhodiola*, *Rosularia*, *Sedella*, *Sedum*, *Sempervivum*, *Sinocrassula*, *Thompsonella*, *Tylecodon*, *Umbilicus*, *Villadia*), Cucurbitaceae (en particular las especies: *Apodanthera*, *Brandegea*, *Cephalopentandra*, *Ceratosanthes*, *Citrullus*, *Coccinia*, *Corallocarpus*, *Cucumella*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cyclantheropsis*, *Dendrosicyos*, *Doyera*, *Eureindra*, *Fevillea*, *Gerrananthus*, *Gynostemma*, *Halosicyos*, *Ibervillea*, *Kedostris*, *Marah*, *Momordica*, *Neoalsomitra*, *Odosicyos*, *Parasicyos*, *Syrigia*, *Telfairia*,

5 *Trochomeria, Trochomeriopsis, Tumamoca, Xerosicyos, Zehneria, Zygosicyos*), *Didiereaceae* (en particular las especies: *Alluaudia, Alluaudiopsis, Decaria, Didieara*), *Dioscoreaceae* (en particular las especies: *Dioscorea*),  
*Ericaceae* (en particular las especies: *Sphyrospermuin*), *Eriospermaceae* (en particular las especies: *Eriospermum*),  
*Euphorbiaceae*, *Fabaceae* (en particular las especies: *Delonix, Dolichos, Erythrina, Neorautanenia, Pachyrhizus, Tylosema*), *Fouquieriaceae* (en particular las especies: *Fouquieria*), *Geraniaceae* (en particular las especies: *Monsonia, Pelargonium*), *Gesneriaceae* (en particular las especies: *Aeschynanthus, Alsobia, Chirita, Codonanthe, Columnea, Nematanthus, Sinnningia, Streptocarpus*), *Hyacinthaceae* (en particular las especies: *Albuca, Bowiea, Dipcadi, Drimia, Drimiopsis, Hyacinthus, Lachenalia, Ledebouria, Litanthus, Massonia, Ornithogalum, Rhadamanthus, Rhodocodon, Schizobasis, Whiteheadia*), *Icacinaceae* (en particular las especies: *Pyrenacantha*),  
10 *Lamiaceae* (en particular las especies: *Aeollanthus, Dauphinea, Perrierastrum, Plectranthus, Solenostemon, Tetradenia, Thornecroftia*), *Lentibulariaceae*, *Loasaceae* (en particular las especies: *Schismocarpus*), *Loranthaceae* (en particular las especies: *Tapinanthus*), *Melastomataceae* (en particular las especies: *Medinilla*), *Meliaceae* (en particular las especies: *Entandrophragma*), *Menispermaceae* (en particular las especies: *Chasmanthera, Stephania, Tinospora*), *Moraceae* (en particular las especies: *Dorstenia, Ficus*), *Nolanaceae* (en particular las especies: *Nolana*),  
15 *Nolinaceae* (en particular las especies: *Beaucarnea, Calibanus, Dasylirion, Nolina*), *Orchidaceae*, *Oxalidaceae* (en particular las especies: *Oxalis*), *Passifloraceae* (en particular las especies: *Adenia*), *Pedaliaceae* (en particular las especies: *Pterodiscus, Sesamothamnus, Uncarina*), *Phyllanthaceae* (en particular las especies: *Phyllanthus*), *Phytolaccaceae* (en particular las especies: *Phytolacca*), *Piperaceae* (en particular las especies: *Peperomia*),  
20 *Portulacaceae* (en particular las especies: *Amphipetalum, Anacampseros, Avonia, Calyptrotheca, Ceraria, Cistanthe, Dendroportulaca, Grahamia, Lewisia, Parakeelya, Portulaca, Portulacaria, Schreiteria, Talinella, Talinum*), *Rubiaceae* (en particular las especies: *Anthorrhiza, Hydnophytum, Hydrophylax, Myrmecodia, Myrmephytum, Phylohydrax, Squamellaria*), *Ruscaceae* (en particular las especies: *Cordyline, Dracaena, Sansevieria*), *Sapindaceae* (en particular las especies: *Erythrophysa*), *Saxifragaceae*, *Sterculiaceae* (en particular las especies: *Brachychiton, Sterculia*), *Urticaceae* (en particular las especies: *Laportea, Obertia, Pilea, Sarcopilea*), *Viscaceae* (en particular las especies: *Viscum*), *Vitaceae* (en particular las especies: *Cissus, Cyphostemma*), *Xanthorrhoeaceae* y *Zygophyllaceae*.

30 Esta etapa 1 se efectúa en una cámara limpia, en atmósfera de aire, con una iluminación constante de más de 100 000 lux, a una temperatura de 30 °C y con una humedad relativa del 50 %. Esta etapa se realiza mediante trasplante sucesivo de una parte de la planta, en particular, de una parte de la raíz. La iluminación era del tipo que emitía más de un 95 % de los rayos (en particular más de un 99 %) en el intervalo de 100 nm a 700 nm, preferentemente de 400 nm a 520 nm.

35 Etapa 2: trasplante de las células desdiferenciadas de la etapa 1 a un medio de cultivo *in vitro* para el desarrollo y la inducción de las células.

40 El desarrollo con inducción de las células de la etapa 1 se realizó en un medio *in vitro* en atmósfera gaseosa que contenía oxígeno y CO<sub>2</sub> según un ciclo que comprendía 100 períodos de poca luminosidad con una luminosidad de menos de 10 lux (de 1 a 5 lux) durante 1 hora en una atmósfera constituida por aire húmedo (humedad relativa del 75 %) enriquecido con CO<sub>2</sub> (para que el contenido de CO<sub>2</sub> fuera del 5 %) y que presentaba una temperatura de 30 °C, estando separados estos períodos de desarrollo/inducción con baja (incluso nula) luminosidad (ventajosamente oscuridad casi total) entre sí por un periodo de luminosidad o de iluminación de más de 100 000 lux (la iluminación era del tipo que emitía más de un 95 % de los rayos (en particular más de un 99 %) en el intervalo de 100 nm a 700 nm, preferentemente de 400 nm a 520 nm) durante 1 hora en una atmósfera constituida por aire húmedo (humedad relativa del 75 %) enriquecido con CO<sub>2</sub> (para que el contenido de CO<sub>2</sub> de la atmósfera fuera del 5 %) y que presentaba una temperatura de 45 °C. El paso de un estado de oscuridad a un estado iluminado se efectúa mediante el desplazamiento de una pared opaca. Este cultivo se efectúa en una cámara limpia o estéril o aséptica.

50 Se ha observado que este procedimiento de cultivo e inducción de las células permitía obtener un contenido mayor de fitoalexinas, flavonoides (rutina, ácido gálico, derivados de isorhamnetina, etc.) con respecto al obtenido mediante cultivo *in vitro* en una atmósfera gaseosa que contenía oxígeno y CO<sub>2</sub> según un ciclo de iluminación permanente, aunque incluso según un ciclo que comprendía períodos de poca luminosidad con una luminosidad de menos de 10 lux (de 1 a 5 lux) durante 12 a 24 horas en una atmósfera constituida por aire húmedo (humedad relativa del 75 %) enriquecido con CO<sub>2</sub> (para que el contenido fuera del 5 %) y que presentaba una temperatura de 30 °C, estando separados estos períodos de baja (incluso nula) luminosidad entre sí por un periodo de luminosidad de más de 100 000 lux durante 12 horas en una atmósfera constituida por aire húmedo (humedad relativa del 75 %) enriquecido con CO<sub>2</sub> (para que el contenido de CO<sub>2</sub> de la atmósfera fuera del 5 %) y que presentaba una temperatura de 45 °C.

55 Se ha observado también que el enriquecimiento de la atmósfera de CO<sub>2</sub> tenía un efecto positivo en la formación de fitoalexinas, flavonoides, etc.

60 Etapa 3: Extracción de las células desdiferenciadas e inducidas en un medio de cultivo *in vitro*, por ejemplo, mediante filtración del medio de cultivo seguida de una o varias etapas de lavado (con o sin enjuagado), efectuadas en particular para no destruir la estructura de las membranas celulares.

65 Las células desdiferenciadas e inducidas en un medio de cultivo, lavadas, se pueden mezclar directamente con uno

o varios excipientes cosméticos (véase la etapa 6). Por ejemplo, las células frescas se mezclan con glicerol y/o uno o varios glicoles y/o uno o varios aceites (ventajosamente de tipo vegetal), siendo ventajosamente la proporción en peso de la mezcla de células vegetales de un 1 a un 20 %, constituyendo esta mezcla, por tanto, un producto apto para su uso en la preparación de una composición cosmética.

5 Etapa 4 opcional, pero ventajosa: Secado o liofilización de las células desdiferenciadas e inducidas en un medio de cultivo *in vitro*, efectuando ventajosamente dicha operación de secado para no destruir la estructura de las membranas celulares.

10 Esta etapa se efectúa ventajosamente a una temperatura inferior a 60 °C, por ejemplo entre -60 °C y 50 °C.

Etapa 5: mezcla y/o incorporación de uno o varios excipientes y/o de otros principios activos (particularmente otras células/materiales triturados vegetales) para la preparación de la composición de uso tópico. Por ejemplo mezcla de las células vegetales frescas en glicerol y/o uno o varios glicoles y/o uno o varios aceites para obtener una composición lista para su uso en la preparación de una composición cosmética tópica mediante la adición de uno o varios excipientes complementarios.

Ejemplo de actividad farmacológica antioxidante

20 La actividad antirradicalaria de las células vegetales producidas mediante el procedimiento descrito anteriormente se ha estudiado *in vitro*, usando un modelo de epidermis reconstituidas SKINETHIC®, que permite revelar esta actividad mediante dosificación de malondialdehído (MDA), tras su inducción con rayos ultravioleta B.

25 En conclusión, las células obtenidas mediante el procedimiento de acuerdo con la invención presentan un efecto antirradicalario tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones de inducción por los rayos ultravioleta B. De este ensayo se desprende un efecto antirradicalario significativo.

Ejemplo de dispersión de células inducidas en una base cosmética

30 Las células vegetales preparadas tal como se ha descrito previamente se usan para la preparación de una composición cosmética. Las células se dispersan tras su liofilización sin haber sido trituradas en la base siguiente:

- agua desmineralizada	85,61 %
- aceite mineral	9,00 %
- alcohol cetílico	3,00 %
- Ceteareth-20	0,75 %
- células vegetales (no trituradas)	0,20 %
- perfume	0,15 %
- carbómero	0,10 %
- metilcloroisotiazolina y metilisotiazolina [Kathon CG]	0,065 %
- hidróxido de sodio (45 %)	0,06 %
- hidroxianisol de butilo	0,06 %
<b>TOTAL</b>	<b>100,00 %</b>

35 La composición obtenida muestra una dispersión homogénea de células en la crema y una granulometría muy fina. El estudio de seguridad mostró la ausencia de gérmenes y de hongos, así como una notable estabilidad de la composición. El resultado obtenido, que se comprobó en un estudio transcutáneo, ha permitido observar el paso de los principios activos, particularmente los polifenoles y otros flavonoides a través del tejido cutáneo.

40 Las células vegetales (no trituradas) se pueden usar en cremas, lociones, champús, geles, soluciones y leches. La proporción de células, en forma de una suspensión viscosa o de un gel o de un polvo esencialmente seco depende de la naturaleza de la composición de uso tópico y de la aplicación deseada. Está comprendida ventajosamente entre un 0,01 y un 5 %, aunque puede llegar hasta el 25 %.

45 Obviamente, la invención no se limita a los ejemplos de realización proporcionados anteriormente y es posible realizar la composición de uso tópico en otras formas, tales como aceites, ungüentos, lacas, productos de maquillaje (base de maquillaje, barra de labios, lápiz, máscara, sombra de ojos) que también están dentro del alcance de la invención.

50 Se ensayaron composiciones cosméticas de acuerdo con la invención (con un contenido del 1 % de material triturado de células vegetales, en forma seca) en voluntarios. Se observó que tales composiciones tenían un efecto antienvejecimiento, un efecto protector de la piel, un efecto antioxidante, antirradicalario, antifúngico, antiacné, de regeneración de la piel, etc.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de una composición de uso tópico que comprende un material derivado de células vegetales de una especie seleccionada entre el grupo constituido por las especies de las familias siguientes:
- 5 *Agavaceae, Amaryllidaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Araceae; Araliaceae, Asclepiadaceae, Asparagaceae, Asphodelaceae, Asteraceae, Balsaminaceae, Begoniaceae, Bombacaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Burseraceae, Cactaceae, Campanulaceae, Capparidaceae, Caricaceae, Chenopodiaceae, Cochlospermaceae, Commelinaceae, Convolvulaceae, Crassulaceae, Cucurbitaceae, Didiereaceae, Dioscoreaceae, Ericaceae, Eriospermaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Fouquieriaceae, Geraniaceae, Gesneriaceae, Hyacinthaceae, Icacinaceae, Lamiaceae, Lentibulariaceae, Loasaceae, Loranthaceae, Melastomataceae, Meliaceae, Menispermaceae, Moraceae, Nolanaceae, Nolinaceae, Orchidaceae, Oxalidaceae, Passifloraceae, Pedaliaceae, Phyllanthaceae, Phytolaccaceae, Piperaceae, Portulacaceae, Rubiaceae, Ruscaceae, Sapindaceae, Saxifragaceae, Sterculiaceae, Urticaceae, Viscaceae, Vitaceae, Xanthorrhoeaceae y Zygophyllaceae, caracterizado por que se ponen células vegetales desdiferenciadas en un medio de cultivo *in vitro* para permitir el crecimiento de las células, al mismo tiempo que su inducción, llevando a cabo dichos crecimiento e inducción en el medio *in vitro* en una atmósfera gaseosa que consiste en aire húmedo enriquecido con CO<sub>2</sub> con un contenido de un 1 a un 5 % en volumen de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa de más del 50 %, a una temperatura comprendida entre 15 °C y 50 °C según con un ciclo que comprende al menos 10 periodos de oscuridad o de baja luminosidad con una luminosidad de menos de 10 lux durante un periodo de 20 minutos a 3 horas, estando separados los periodos de oscuridad o de poca luminosidad entre sí por un periodo de luminosidad en el intervalo de 100 nm a 700 nm, preferentemente de 400 nm a 520 nm, de más de 1000 lux durante un periodo de 1 a 6 horas, por que se cultivan y se inducen dichas células vegetales desdiferenciadas en su medio de cultivo durante este ciclo suficientemente largo para la síntesis de una cantidad suficiente de metabolitos en las células desdiferenciadas inducidas, por que se separan, al menos parcialmente, las células del medio de cultivo, y por que se mezclan las células vegetales desdiferenciadas e inducidas, no trituradas, separadas al menos parcialmente del medio de cultivo, con uno o varios excipientes aceptables para aplicación tópica a fin de preparar la composición tópica.*
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la atmósfera contiene un 5 % en volumen de CO<sub>2</sub>.
3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado por que** el ciclo comprende al menos diez periodos de oscuridad o de poca luminosidad separados entre sí por un periodo de luminosidad, en el intervalo de 400 nm a 520 nm, de más de 10 000 lux.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el ciclo comprende al menos diez periodos de oscuridad o de poca luminosidad separados entre sí por un periodo de luminosidad de más de 100 000 lux.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el paso de un periodo de oscuridad o de luminosidad inferior a 10 lux a un periodo de luminosidad de más de 1000 lux se efectúa en un tiempo de menos de 2 minutos.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** el paso de un periodo de oscuridad o de luminosidad inferior a 10 lux a un periodo de luminosidad de más de 50 000 lux se efectúa en un tiempo de menos de 2 minutos.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** las células vegetales se han inducido en un medio *in vitro* en una atmósfera que comprende agua para obtener una humedad relativa próxima a la saturación.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el desarrollo con inducción de las células se efectúa según un ciclo que comprende 100 períodos de oscuridad o de poca luminosidad de menos de 10 lux durante 1 hora en una atmósfera constituida por aire húmedo con una humedad relativa del 75 % y enriquecido con CO<sub>2</sub> para que su contenido sea del 5 % y que presenta una temperatura de 30 °C, estando separados los periodos de oscuridad o de poca luminosidad entre sí por un periodo de luminosidad de más de 100 000 lux que emite más de un 95 % de los rayos en el intervalo de 100 nm a 700 nm, durante 1 hora en una atmósfera constituida por aire húmedo con una humedad relativa del 75 % y enriquecido con CO<sub>2</sub> para que su contenido sea del 5 % y que presenta una temperatura de 45 °C.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** la iluminación de los periodos de luminosidad de más de 100 000 lux se efectúa mediante una iluminación que emite más de un 99 % de los rayos en el intervalo de 400 nm a 520 nm.