(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 322 530**

(21) Número de solicitud: 200703395

(51) Int. Cl.:

C09B 61/00 (2006.01)
G01N 21/33 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 35/36 (2006.01)
A61Q 1/02 (2006.01)
A61Q 5/10 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **21.12.2007**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2009**

Fecha de la concesión: **17.03.2010**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.04.2010**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **16.04.2010**

(73) Titular/es:
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **Jarén Galán, Manuel;**
Garrido Fernández, Juan y
Negro Balmaseda, Juan José

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Procedimiento de obtención de melaninas y sus aplicaciones.**

(57) Resumen:
Procedimiento de obtención de melaninas y sus aplicaciones.
La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención y posterior cuantificación de pigmentos de melaninas, caracterizado porque comprende las etapas de: tratamiento inicial alcalino, separación de las feomelaninas, obtención del concentrado seco de eumelanina mediante lavado del precipitado y posterior centrifugación, solubilización del concentrado seco de eumelanina mediante oxidación alcalina controlada en el tiempo, y neutralización de las soluciones para obtener concentrados secos de feomelanina y pseudofeomelanina. Específicamente, se describe la obtención de concentrados secos de feomelanina, eumelanina y pseudofeomelanina naturales a partir de plumas de ave o de pelos coloreados de mamífero, y su uso como materia prima para fines industriales en cosmética (cremas, maquillajes y tintes) y dermatología (para tratamiento de enfermedades que cursan con despigmentación).

ES 2 322 530 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de melaninas y sus aplicaciones.

Sector de la técnica

La presente invención se engloba dentro del sector de la química. Concretamente describe la obtención y posterior cuantificación de melaninas purificadas por medio de una técnica de bajo coste. Específicamente describe la obtención de concentrados secos de feomelanina, eumelanina y pseudofeomelanina naturales a partir de plumas de ave o de pelos coloreados de mamífero, que pueden ser empleados como materia prima para fines industriales en cosmética (cremas, maquillajes y tintes) y dermatología (para tratamiento de enfermedades que cursan con despigmentación).

Estado de la técnica

Melanina es un término general que describe una familia de pigmentos quinol-fenólicos de diverso origen y naturaleza química. Dependiendo de su procedencia biológica, las melaninas se dividen en tres grupos: microbiales, animales y vegetales. Existen también melaninas sintéticas. Las melaninas animales son los pigmentos más comunes en el tegumento de los vertebrados (McGraw 2006), incluyendo la piel de los humanos (Jablonski 2006). Desde el punto de vista químico, existen dos tipos básicos de melaninas: feomelaninas y eumelaninas, que dan lugar a la enorme paleta de colores melánicos observada de acuerdo a su concentración, proporciones relativas y contraste con zonas despigmentadas. Las feomelaninas contienen azufre y se perciben como coloraciones rojizas o rubias, tanto en el pelo o la piel de los mamíferos como en las plumas de las aves. Las eumelaninas son negras o pardas, y ese es el color que confieren a las estructuras tegumentarias.

A diferencia de los carotenoides, pigmentos exclusivamente vegetales que deben ser ingeridos en la dieta, y que son responsables de los colores más brillantes de las aves, incluyendo amarillos y rojos, las melaninas son sintetizadas por el propio organismo a partir de precursores aminoácidos. También difieren en que mientras las melaninas pueden aparecer dentro de una misma pluma como bandas o puntos alternados con zonas despigmentadas o con diferente grado de mecanización, los carotenoides ocupan regiones continuas de color. Esta característica permite infinitas variantes, y así, por ejemplo, las aves de presa diurnas (*Orden Falconiformes*, con unas 300 especies), presentan plumajes distintivos y específicos exclusivamente melánicos y aún numerosas especies entre ellas presentan gran variación individual. Entre las palomas asilvestradas (*Columba livia*) se han descrito más tipos básicos de coloración que en ninguna especie de ave silvestre, y esa multiplicidad fenotípica de nuevo responde a múltiples combinaciones de tonos melánicos.

En cuanto a la función de las melaninas en el tegumento, se presupone esencialmente fotoprotectora, ya que evita los daños que causa la radiación ultravioleta (W) del sol. Tienen, no obstante, otras funciones potenciales: debido a su estructura pueden proteger células y tejidos del estrés oxidativo atrapando radicales libres (McGraw 2006) y, en el caso de las plumas de las aves, se ha sugerido que las plumas melanizadas son más resistentes al deterioro por abrasión o rotura mecánica (Burtt 1986), y quizá también al ataque de bacterias (Burtt e Ichida 1999) aunque este último aspecto ha sido puesto en entredicho recientemente (Grande y Cols 2004).

A pesar de la enorme prevalencia de las melaninas en el tegumento de los vertebrados, y del enorme interés suscitado por el análisis del color en el marco de los estudios evolutivos y del comportamiento (e.g., Hill y McGraw 2006), no existen procedimientos analíticos sencillos para identificarlas y cuantificarlas. Las melaninas presentan una estructura compleja y ha sido históricamente muy difícil analizarlas bioquímicamente (Ito 2000). En la actualidad para extraerlas se utilizan métodos químicos (Ito y Fujita 1985) o enzimáticos (Liu *et al*. 2003). Los métodos químicos, que se basan en extracciones ácido/base y fragmentaciones oxidativas y están considerados como muy agresivos porque alteran la estructura molecular de la melanina, dan lugar a metabolitos incoloros que son posteriormente separados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cuantificados por detección UV-visible y detector electroquímico (Liu *et al*. 2003). Los métodos químicos de extracción de melaninas se pueden dividir en dos grandes grupos: el primer grupo consiste en la extracción de melaninas con disolventes adecuados, fundamentalmente álcalis, y posterior eliminación de la mezcla acompañante. El segundo grupo de métodos consiste en extraer todas las demás materias, a excepción de la melanina, mediante hidrólisis ácida y lavado con un disolvente adecuado hasta obtener la melanina. Por otra parte, los métodos enzimáticos de extracción están basados en el uso de proteasas que degradan las queratinas que envuelven a las melaninas en el pelo o en las plumas (Liu 2003).

Por lo que respecta a los plumajes de las aves, se ha descrito que en toda pluma melanizada co-existen feo- y eumelanina en diferentes proporciones. Para la determinación y cuantificación de ambos tipos de melaninas en plumas, en la actualidad se siguen utilizando los procedimientos de Ito y Fujita (1985) con algunas modificaciones posteriores (Ito y Wakamatsu 1994, Wakamatsu e Ito 2002). Sus métodos se basan en el análisis mediante HPLC de los productos de degradación de la eumelanina tras ser oxidada y de la feomelanina tras ser hidrolizada. Para calcular su concentración es preciso utilizar, no obstante, factores de corrección, puesto que la conversión en productos de degradación es incompleta.

Debido a que los métodos de laboratorio son relativamente complejos, hasta muy recientemente sólo se ha determinado la proporción y concentración de eumelaninas y feomelaninas en el plumaje de 13 especies de aves (McGraw 2006). Esto contrasta con la identificación y cuantificación de carotenoides en 150 especies de aves, e indica que los

estudios de melanización en aves están en su infancia. Un método simplificado con resultados repetibles es necesario y ese ha sido el objetivo de la presente invención. Basándose en el hecho de que la feomelanina es fácilmente solubilizable en medio alcalino pero la eumelanina es insoluble tanto en medio ácido como alcalino, el procedimiento presentado en esta invención describe, por primera vez, un método para la obtención de la fracción feomelánica por un lado y de la fracción eumelánica por otro, partiendo de una digestión alcalina a partir de pluma de ave o de pelo coloreado de mamífero. Además, la posibilidad de solubilizar el concentrado insoluble de eumelanina en forma de pseudofeomelanina en medio alcalino, permite cuantificar espectrofotometricamente la concentración relativa de feomelanina y eumelanina sin necesidad de recurrir al HPLC. Por otro lado, este método permite obtener concentrados secos de las tres fracciones, feomelaninas, eumelaninas y pseudosfeomelaninas, que pueden ser empleados como materia prima natural para su uso en cosmética o dermatología.

Descripción de la invención

Descripción breve

En la presente invención se describe, por primera vez, un procedimiento para la obtención, a partir de una materia prima de nula utilidad como es la pluma de ave o ciertos pelos coloreados de mamífero, de extractos purificados de feomelanina, eumelanina y pseudofeomelanina. Dicho procedimiento es sencillo y poco costoso, y permite la utilización de los extractos obtenidos tanto para cremas fotoprotectoras, como para maquillaje con fines cosméticos o fines dermatológicos en enfermedades que cursan con despigmentación de la piel. Además, la presente invención presenta un procedimiento simple y fiable de cuantificación de melaninas.

Por tanto, un aspecto de la presente invención lo constituye un procedimiento de separación, cuantificación y obtención de concentrados sólidos de feomelanina, eumelanina y pseudoeumelanina basado en la solubilidad conocida de las feomelaninas en medio alcalino y que comprende las siguientes etapas:

i) disolución de un homogeneizado de plumas libres del raquis en medio alcalino, preferentemente con NaOH al 20% en agua, en un baño con sonicación, preferentemente a 60ºC, durante al menos 20 minutos, preferentemente 40 minutos,

ii) separación de la fracción feomelánica soluble, preferentemente mediante centrifugación, de la fracción eumelánica precipitada,

iii) obtención de un precipitado de eumelanina libre de feomelaninas, mediante lavado, preferentemente con una solución acuosa de NaOH al 20% y agitación constante, y posterior centrifugación,

iv) solubilización en medio alcalino, preferentemente solución acuosa de NaOH al 20%, de la fracción eumelánica precipitada, libre de feomelaninas, mediante transformación oxidativa en pseudofeomelanina, preferentemente con H_2O_2 al 30% en agua, detenida por la acción de un antioxidante, preferentemente $HNaSO_3$ al 40% en agua, y posterior centrifugación,

v) cuantificación relativa de las soluciones feomelánica y pseudofeomelánica espectrofotométricamente a 450 nm, y

vi) obtención de concentrados sólidos de feomelanina, y pseudofeomelanina mediante neutralización, preferentemente con HCl, y posterior centrifugación.

Otro aspecto de la invención lo constituye el uso de los concentrados sólidos de feomelanina, eumelanina y pseudofeomelanina obtenidos por el procedimiento de la invención, como materia prima para fines industriales para la elaboración de composiciones cosméticas (cremas, pomadas o aerosoles) o dermatológicas (en enfermedades que cursen con despigmentación) o protectores solares frente a la radiación UV.

Las composiciones cosméticas así obtenidas pueden comprender otros productos, por ejemplo: maquillaje de piel, pestañas, cejas, labios o uñas, tintes para cabellos o para vello, tintes para tatuajes, o cualquier otro producto de uso cosmético.

Descripción detallada

La presente invención se enfrenta al problema de ofrecer un procedimiento simplificado y reproducible para la determinación de melaninas, y más concretamente para la determinación de los tipos básicos de melaninas, eumelaninas y feomelaninas, y un procedimiento de extracción y obtención de ambos tipos de melaninas en estado sólido.

El presente procedimiento de determinación de eumelaninas y feomelaninas se basa en un tratamiento inicial alcalino para separar feomelaninas, y una oxidación alcalina controlada en el tiempo de las eumelaninas insolubles para transformarlas, de forma estequiométrica, en pseudofeomelaninas solubles en medio alcalino. Posteriormente, la concentración relativa de feomelaninas y eumelaninas se mide, espectrofotométricamente, analizando las primeras directamente y las últimas a partir de su producto soluble obtenido oxidativamente, sin necesidad de recurrir a HPLC. Es importante destacar que no existe actualmente ningún método en el que se obtengan las fracciones feomeláni-

ca y eumelánica por separado partiendo de una digestión alcalina a partir de pluma de ave o de pelo coloreado de mamífero.

Concretamente, el procedimiento para la separación inicial de las feomelaninas se inicia con una digestión alcalina de la materia prima utilizada mediante la adición de NaOH al 20% disuelto en agua. La digestión se realiza en un baño con sonicación a temperatura controlada, preferentemente a 60ºC, durante 40 minutos con agitación periódica de la muestra.

Una vez terminada la digestión alcalina, se procede a la separación de la fracción feomelánica soluble de la fracción eumelánica precipitada, preferentemente mediante centrifugación. Más concretamente, la muestra se centrifuga durante 15 minutos a 17500 g y 4ºC, retirándose el sobrenadante constituido por la fracción de feomelaninas solubilizadas y por el material solubilizado tras la digestión, formado fundamentalmente por aminoácidos libres provenientes de la queratina de la pluma. El precipitado se reserva para el posterior estudio de la fracción eumelánica.

La determinación de la solución coloreada, que constituye la fracción feomelánica, se realiza en un espectrofotómetro. Más concretamente, la determinación se realiza mediante la medida de absorbancia a 450 nm restándole la obtenida a 600 nm frente a un blanco de solución acuosa de NaOH al 20%. El resultado obtenido se divide por el peso de muestra original para expresar la concentración de feomelaninas como UA/g de materia prima.

Para la determinación de la concentración de la fracción eumelánica precipitada, obtenida tras la digestión con NaOH, en primer lugar se realiza un lavado para eliminar posibles restos de feomelaninas. En concreto, a la fracción eumelánica precipitada se le adiciona 1 mL de NaOH al 20% en agua, se agita, hasta obtener una suspensión, y se centrifuga a 17500 g durante 15 minutos. El sobrenadante se desprecia y se repite el proceso de lavado una segunda vez. El precipitado resultante, que se seca en una estufa a 60ºC, constituye la fracción eumelánica, insoluble en condiciones alcalinas, libre de feomelaninas.

La determinación del contenido de eumelaninas, una vez que el precipitado está limpio de restos de feomelaninas solubilizadas, requiere de la solubilización previa del precipitado. Esta solubilización se lleva a cabo mediante un proceso de oxidación que se inicia con la adición, al precipitado de eumelaninas, de 1 mL de NaOH al 20% en agua, permaneciendo en condiciones de agitación constante hasta obtener la completa resuspensión del precipitado. A esta suspensión se le adicionan posteriormente 0.02 mL de H_2O_2 al 30% en agua, la mezcla se agita enérgicamente y se sumerge en baño a 60ºC con sonicación durante 10 minutos contados desde el momento de la adición del agua oxigenada. La reacción de oxidación de las eumelaninas se detiene por la adición de un antioxidante, concretamente 0.050 mL de $HNaSO_3$ al 40% en agua, y agitación. Tras la reacción de oxidación se procede a la centrifugación y medida espectrofotométrica de la solución de eumelaninas transformadas por oxidación en pseudofeomelaninas en idénticas condiciones a las descritas anteriormente para la fracción feomelánica, expresándose igualmente los resultados como UA/g de pluma.

Una característica adicional de la presente invención, es la obtención de concentrados secos de feomelanina y pseudofeomelanina a partir de un proceso de neutralización de las soluciones utilizadas para las cuantificaciones. En concreto, las soluciones de feomelanina y pseudofeomelaninas son neutralizadas, separadamente, con ácido clorhídrico (HCl) en dos etapas empleando en primer lugar HCl al 20% hasta alcanzar un pH cercano a 8-9 unidades y posteriormente, con HCl 0.1 N, se termina de neutralizar la disolución hasta alcanzar un pH comprendido entre 6-7 unidades. La solución neutralizada se deja enfriar y se centrifuga a 17500 g durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se desprecia y el precipitado, una vez lavado mediante resuspensión con agua desionizada y posterior centrifugación en idénticas condiciones, es finalmente secado en una estufa a 60ºC. El precipitado obtenido está constituido por la fracciones feomelánica o pseudofeomelánica respectivamente.

Los sólidos precipitados (feomelánico, pseudofeomelánico y eumelánico) son intensamente coloreados y se interponen con facilidad con diluyentes por dispersión mecánica. No son solubles en medio hidrofílico ni lipofílico, simplemente son dispersables en sólidos o semisólidos de alta viscosidad, dando coloraciones distintas en función de su concentración y de la coloración original del excipiente.

La metodología de determinación propuesta supone un avance notable en el campo de las melaninas. Con tratamientos sencillos y poco costosos se puede cuantificar de forma directa el contenido en feomelaninas y de forma indirecta el de eumelaninas por correlación con la medida directa de pseudofeomelaninas. La cuantificación es aproximada puesto que aún no se ha establecido el grado de pureza que se alcanza en los precipitados de feo y eumelanina que permita establecer el coeficiente de extinción para su exacta cuantificación. En cualquier caso la obtención de este parámetro no resulta vital ya que los resultados que se obtengan por medida de absorbancia dividida por el peso de muestra solo estarán faltos de multiplicarse por este factor, y para el propósito general de medida del contenido de melaninas que es comparar entre especies, el coeficiente de extinción se simplificaría por aparecer en los dos miembros de la ecuación.

Como ventaja adicional, esta metodología permite obtener concentrados secos de feomelanina, pseudofeomelanina y eumelanina que pueden ser empleados como materia prima natural para fines industriales en cosmética o dermatología. Las melaninas son los pigmentos naturales de la piel y una de sus funciones es la fotoprotección. Al obtenerlos de forma aislada es posible conseguir, por combinación entre ellos a distintas proporciones, todas las tonalidades de piel existente, y podrían ser empleados en forma de crema, pomadas o aerosoles como una segunda piel que realizara

la función fotoprotectora frente a la radiación UV, sin que esta función tuviera que sufrirla nuestra propia piel (por ejemplo, para protectores solares). Al mismo tiempo, la amplia gama de tonalidades naturales que se pueden conseguir permitiría también su uso como agente maquillante del color natural de la piel, tanto con fines cosméticos (por ejemplo como maquillaje de piel, pestañas, cejas o uñas, tintes para cabellos...) como con fines dermatológicos en enfermedades que cursen con despigmentación de la piel.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Se muestra como transcurre el proceso de solubilización de feomelaninas en función del tiempo.

Figura 2. Constatación de la linealidad existente entre el contenido en feomelaninas en las muestras y la absorbancia medida en tres especies distintas de aves.

Figura 3.- Detalle de microscopia electrónica del sólido obtenido tras la separación de la fracción feomelánica y lavado con agua del precipitado. Conjunto de melanosomas conteniendo eumelanina.

Figura 4.- Evolución del contenido en materia insoluble y color de naturaleza eumelánica en muestras tratadas en condiciones de oxidación alcalina en presencia y ausencia de antioxidante.

Figura 5.- Espectro de FT-IR de feomelanina, eumelanina y su producto de oxidación alcalina, pseudofeomelanina.

Figura 6.- Constatación de la linealidad existente entre el contenido en eumelaninas en las muestras y la absorbancia medida en tres especies distintas de aves.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

Metodologías de extracción, cuantificación y precipitación de feomelaninas

1.1.- *Separación de feomelaninas por solubilización en medio alcalino*

El procedimiento puesto a punto se basa en la solubilidad conocida de las feomelaninas en medio alcalino. Se emplea pluma de gallo de coloración negra en la base y coloración dorada oscura en las puntas. Se corta en pequeños trozos de aproximadamente 1 g de plumas libres de raquis y se deshacen y mezclan para homogeneizar. Se toman veinte muestras de aproximadamente 5 mg que se introducen en tubos Eppendorf, de 1.5 mL de capacidad y con cierre hermético, y se les adiciona simultáneamente 1 mL de NaOH al 20%. El conjunto de tubos se introduce en baño de sonicación termostatizado a 60ºC. Cada 5 minutos se retiran dos tubos que, para minimizar la re-extracción posterior al tiempo establecido, se sumergen en baño de hielo y se centrifugan a 4ºC y 17.500 g durante 15 minutos. A continuación, se mide la absorbancia del sobrenadante a 450 nm restándole la absorbancia medida a 600 nm frente a un blanco de solución acusa de NaOH al 20%, expresando los resultados en unidades de absorbancia por gramo de pluma de cada muestra. En la Figura 1 se muestra como transcurre el proceso de solubilización de feomelaninas en función del tiempo. Desde t=0 existe un incremento gradual del color solubilizado que se estabiliza a partir de t=20. Desde este momento no existe incremento en la cantidad de color solubilizado, que permanece constante durante todo el tiempo posterior. La constancia en el tiempo de la cantidad de color extraído garantiza que la extracción se ha completado y que la disolución de feomelaninas es estable y no se produce degradación del color en las condiciones de solubilización.

Con la aplicación de este mismo procedimiento a plumas estructuralmente distintas, se ha observado que en plumas gruesas y recias como son las de buitre, la digestión alcalina es más lenta, mientras que en plumas pequeñas y de baja compactación, la digestión de las queratinas y la solubilización de las feomelaninas se produce rápidamente. Para todas las muestras estudiadas el tiempo de solubilización ha sido en todos los casos inferior a 30 minutos, por lo que se ha fijado como tiempo de digestión 40 minutos, tiempo en el que existe garantía de que las feomelaninas han sido completamente solubilizadas en todas las muestras.

La solubilización de feomelaninas se completa prácticamente en los veinte primeros minutos (Figura 1), sin embargo, se prolonga hasta 40 minutos el tiempo de reacción para conseguir la perfecta disgregación del material de la pluma. En plumas con contenido eumelánico, este factor es importante para los posteriores tratamientos ya que la digestión previa de 40 minutos libera completamente los melanosomas haciéndolos accesibles al posterior tratamiento oxidativo (figura 2).

La cantidad de color extraído es función del peso empleado, siguiendo la ley de Lambert-Beer, en un amplio rango de peso siempre que se mantengan idénticos el resto de los parámetros fijados para la extracción. Empleando plumas de tres especies con contenido feo y eumelánico, en la figura 2 se puede observar que la linealidad existente entre peso de pluma y absorbancia obtenida tiene un coeficiente de correlación (r) en los tres casos superior a 0.98.

La reproducibilidad de las medidas efectuadas se ha comprobado empleando plumas de tres especies distintas, buitre leonado (*Gyps fulvus*), quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) y elanio (*Elanus caeruleus*). En cada especie se han tomado plumas y se ha realizado un homogeneizado del cual se han tomado cuatro muestras. En cada muestra se ha determinado el contenido en feomelanina expresando los resultados en UA/g y se han calculado las medias, desviación estándar, intervalo de confianza y porcentaje de variabilidad en la determinación. Los resultados se exponen en la tabla 1.

TABLA 1

Reproducibilidad del proceso de extracción y cuantificación de feomelaninas

	Media UA/ g	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza	Porcentaje de variabilidad
B. Leonado	280,33	9,59	9,40	3,35
Quebrantahuesos	49,51	3,36	3,30	6,66
Elanio	72,056	5,88	5,76	8,00

La variabilidad entre replicados, cuando se utilizan plumas de buitre leonado como materia prima, llega a ser de un 3.35%, lo que indica que la metodología empleada tiene una alta reproducibilidad. Sin embargo, en algunas muestras esta variabilidad llega a ser de hasta el 8%. El hecho de que la variabilidad del método de cuantificación sea función de la muestra, pone claramente de manifiesto que la homogeneidad es un factor crítico para obtener una buena reproducibilidad. Se ha comprobado la variabilidad que en sí misma tiene la materia prima, para ello se ha determinado en pluma primaria de buitre leonado el contenido en feomelanina en la parte basal, media y distal de la pluma. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Variabilidad en el contenido de feomelaninas en distintas partes de la pluma de buitre leonado

	Media UA/ g	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza	Porcentaje de variabilidad
Base	42,97	1,49	2,06	4,81
Medio	291,78	1,94	2,68	0,92
Extremo	240,40	7,60	10,54	4,38

En cada zona de la pluma existe un distinto contenido feomelánico. No se puede por tanto hablar de un contenido feomelánico en una determinada especie de ave, ni incluso en una determinada pluma del ave. La concentración varia en función de la especie de ave, del tipo de pluma e incluso de la zona de la pluma. La metodología aplicada tiene, no obstante, una aceptable repetibilidad y para aplicarla hay que especificar muy bien qué materia prima es la que se va a analizar porque no se obtendrán resultados comparables si el análisis se realiza sobre una zona concreta de distintas plumas o sobre un homogeneizado de plumas en el que se incluyen las distintas partes.

1.2.- *Obtención de feomelaninas en estado sólido*

Para la obtención del concentrado de feomelaninas en estado sólido, la solución alcalina conteniendo las feomelaninas solubilizadas se lleva a neutralidad con HCl al 20% hasta que solución alcanza un pH alcalino cercano a la neutralidad y se termina de acceder hasta el punto de neutralidad empleando HCl 0.1 N para poder ajustar con más exactitud que el pH final no baje de 6. En condiciones de neutralidad las feomelaninas se hacen insolubles formando una fina suspensión que se separa mediante centrifugación a 17500 g durante 20 minutos y temperatura de 4ºC. La suspensión está formada por un polvo fino con poca tendencia a precipitar, por lo que a veces la precipitación no es completa y el sobrenadante retiene algo de color. En este caso puede hacerse necesario repetir el proceso de centrifugación e incluso en condiciones más enérgicas para conseguir la completa precipitación. El sobrenadante se retira y se resuspende el precipitado en agua desionizada, posteriormente se centrifuga en idénticas condiciones a las anteriores y se repite el proceso de lavado una segunda vez obteniéndose finalmente un precipitado enriquecido en feomelaninas.

Ejemplo 2

Puesta a punto de metodologías de extracción y cuantificación de eumelaninas

2.1.- *Obtención del precipitado sólido de eumelaninas*

En plumas con contenido eumelánico, tras el tratamiento de solubilización de feomelaninas, el precipitado retiene un intenso color negro constituido por los melanosomas que contienen eumelanina (figura 3). El residuo obtenido se lava y centrifuga hasta tres veces con solución acuosa de NaOH al 20t para eliminar los restos de disolución coloreada procedente de la primera extracción. En estas condiciones no se produce una nueva re-extracción y el color que se observa son restos de la primera extracción que impregnan el residuo y generalmente, sobre todo en plumas de bajo contenido feomelánico, tras el primer lavado, el resto es absolutamente incoloro, constituyendo el precipitado eumelánico libre de feomelaninas.

2.2.- *Solubilización del precipitado sólido de eumelaninas en forma de pseudofeomelaninas por oxidación alcalina controlada en el tiempo*

La solubilización del residuo eumelánico sólido, libre de feomelaninas, se lleva a cabo mediante un tratamiento oxidativo en medio alcalino. Para ello, se lleva a cabo en primer lugar la resuspensión del precipitado eumelánico en 1 mL de solución de NaOH al 20% mediante agitación y posterior sonicación en baño de ultrasonidos. Tras la resuspensión, el tratamiento oxidativo se realiza adicionando 0,02 mL de H_2O_2 al 30%. La reacción se realiza en baño ultrasónico a 60ºC y se deja transcurrir durante 10 minutos.

Para estudiar los procesos que ocurren durante el tiempo posterior a la adición de H_2O_2, se emplea pluma de gallo con contenido en feo y eumelaninas. Con el fin de poder realizar el seguimiento del proceso de solubilización del material sólido, la metodología previamente descrita se modifica puntualmente escalándolo veinte veces. Se trocean y deshacen 10 g de pluma libres de cañón. Se toman 45 muestras de 0.1 g que se depositan cada una en tubos de centrífuga de 50 mL previamente tarados y se les aplica el tratamiento de eliminación de feomelaninas empleando 20 mL de NaOH al 20% en cada una de las muestras. Terminada la extracción de feomelaninas, el precipitado eumelánico se lava repetidas veces con NaOH al 20% y se centrifuga para eliminar las sales y todo el material soluble. El residuo lavado posteriormente se seca en estufa y se determina el peso de cada una de las muestras para conocer el contenido en concentrado eumelánico del que se parte antes de comenzar el tratamiento oxidativo. Por coherencia con el estudio de feomelaninas, las medidas de contenido en eumelaninas se expresan igualmente en unidades de absorbancia por gramo de pluma inicial.

El residuo seco se resuspende en 20 mL de NaOH al 20%. A t=0 se adiciona a todas las muestras 0.4 mL de H_2O_2 al 30% y se depositan inmediatamente las muestras en las condiciones de reacción. Periódicamente se retiran tres muestras a las que se adiciona 1 mL de $HNaSO_3$ al 40% y se agita enérgicamente. Se centrifuga la muestra a 17500 g durante 15 minutos a 4ºC y se retira el sobrenadante para su medida espectrofotométrica. El precipitado se lava repetidas veces con agua desionizada y se seca en la estufa para determinar su peso. Posteriormente a t=10 no se realiza determinación del peso por no existir precipitado en ninguna de las muestras. Hasta alcanzar el punto t=10 minutos, se han retirado de las condiciones de reacción 15 muestras. Al llegar a t=10 minutos, a quince de las treinta muestras que se mantienen en las condiciones de reacción se les añade 1 mL de $HNaSO_3$ al 40%, se agitan enérgicamente y se devuelven al baño. Con estas muestras se realizará el estudio del progreso de la reacción en presencia del antioxidante manteniendo las condiciones de reacción. En el resto de las muestras no se adiciona nada y se deja transcurrir la reacción para conocer qué ocurre con las eumelaninas formadas en ausencia del agente oxidante.

Por encima de t=10 se retiran del baño periódicamente seis muestras, tres de ellas correspondientes a muestras a las que se les ha adicionado antioxidante y otras tres correspondientes al grupo en que el antioxidante no se les ha adicionado previamente y que se les adiciona en el momento en el que se saca la muestra del baño. En la figura 4 se resume todo lo que ocurre durante el tiempo de reacción.

Tras la adición de H_2O_2 se produce una inmediata solubilización del color, a la vez que un fuerte descenso en la cantidad de material sólido. El ritmo de solubilización de color se ralentiza a medida que desciende la cantidad de material sólido en suspensión. El máximo de color solubilizado se alcanza a los 5-7 minutos de reacción. Desde ese momento aparece un ligero descenso en la absorbancia de la solubilización, indicativo de que el medio oxidante además de permitir la solubilización del color originalmente eumelánico, también provoca destrucción de éste, por lo que hay que tener en cuenta que existe una reacción paralela de destrucción de color que coexiste mientras se produce la solubilización de éste y que se hace visible una vez que el aporte de nuevo color por solubilización es menor que la destrucción oxidativa. En el minuto diez la reacción se ha desdoblado entre aquella que transcurre en presencia de antioxidante y en ausencia de este. Tras la adición de sulfito, no existe en ninguna muestra destrucción del color, mientras que en las muestras en las que no se ha adicionado sulfito aparece un progresivo descenso en la cantidad de color por peso de pluma, indicativo claramente de la existencia de una reacción de degradación del producto solubilizado que se ha generado previamente. La reacción de degradación que aparece sigue claramente una cinética de orden 0, lo que indica que no existe limitación del sustrato oxidante para degradar el color solubilizado. Se puede asegurar que la reacción de degradación ha existido en el medio de reacción desde el mismo

momento en que las eumelaninas empiezan a oxidarse y solubilizarse, hecho que ocurre inmediatamente después de t=0.

La reacción paralela de degradación deja de estar enmascarada por la reacción de solubilización de melaninas justamente en el momento en que éstas se agotan, es decir a t=10, y tras este punto aparece como única reacción. El aislamiento de la reacción de degradación por encima de t=10 permite extrapolar la incidencia de la degradación durante el tiempo en que la reacción se encuentra enmascarada por la solubilización de eumelaninas oxidadas.

Extrapolando los valores medidos durante la reacción de destrucción de eumelaninas oxidadas entre los tiempo t=10 y t=20, con los teóricos que existirían a t=0 permiten conocer, que de no haber habido reacción de degradación en el intervalo entre t=0 y t=10, el valor de absorbancia medido debería haber sido 152.

Por otro lado en las muestras en las que se ha adicionado el antioxidante, la reacción de degradación se ha paralizado, y la coloración que se mide es estable, al menos en el plazo de los 20 minutos que se ha dejado transcurrir la reacción. El procedimiento de estabilización mediante antioxidante es efectivo y permite tener un margen de tiempo razonable para la medida espectrofotométrica teniendo certeza de que no está ocurriendo ninguna reacción degradativa. Sin embargo, la medida efectuada de esta forma está afectada por el error de la infracuantificación de eumelaninas oxidadas por la destrucción que ha ocurrido de éstas durante el periodo necesario para la solubilización de las eumelaninas oxidadas. De hecho, el valor medido es 136, cuando según la extrapolación realizada de la recta de degradación debería haber sido 152. El estudio simultáneo de ambas reacciones permite conocer el valor real que se mide y el valor teórico que se debería haber medido, por lo que se puede calcular el factor de conversión entre uno y otro, que es de 1,119. Es decir, la medida real que se hace a t=10 debe multiplicarse por 1,119 para obtener el valor que teóricamente hubiera dado la muestra inicial si no hubiera existido una reacción paralela de degradación.

La cuantificación de eumelaninas no puede realizarse directamente por ser insolubles, pero mediante tratamiento oxidativo se transforma la eumelanina original en otro compuesto coloreado y soluble en medio alcalino que sí puede ser cuantificado como en el caso de feomelanina y correlacionar el valor obtenido con el contenido eumelánico original. Las características del producto formado recuerdan en parte a las que posee la feomelanina, como son su solubilidad en medio alcalino y mostrar una coloración aparente con tonos marrones dorados, muy distinta del color negro intenso que tienen las eumelaninas intactas.

El análisis del espectro de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FT-IR) de feomelaninas, eumelaninas y eumelaninas oxidadas (Figura 5) pone de manifiesto que las eumelaninas y feomelaninas difieren en la zona de número de onda comprendida entre 1000 y 1400 y en la que suelen absorber grupos funcionales del tipo sulfónidos o sulfonas. Tras el tratamiento oxidante de las eumelaninas en medio alcalino, se forma un nuevo compuesto que mantiene aproximadamente el espectro original de eumelanina pero se atenúan las diferencias encontradas en la zona de número de onda comprendido entre 1000-1400 y el espectro del producto obtenido se hace mucho más parecido al de feomelaninas, sin llegar a ser idéntico, por lo que la eumelanina original parece haberse transformado espectralmente en un compuesto similar a la feomelanina, con el que también comparte otras propiedades físicas y químicas, como es la solubilidad en medio alcalino y color aparente. A este nuevo compuesto formado por oxidación de eumelaninas, y similar en determinadas propiedades a feomelanina, se le ha denominado pseudofeomelanina.

Por la transformación que experimenta la eumelanina, es posible cuantificarla espectrofotométricamente como pseudofeomelanina a 450 nm restándole la absorbancia a 600 nm y dividiendo la absorbancia medida por el peso de pluma empleado. La muestra sacada a t=10 y estabilizada inmediatamente con $HNaSO_3$ es la adecuada para realizar la cuantificación de pseudofeomelanina midiendo su absorbancia. El resultado obtenido debe corregirse multiplicando el valor obtenido por 1,119 para contemplar las pérdidas ocurridas por co-oxidación.

La metodología de medida de contenido en eumelaninas por cuantificación de sus correspondientes pseudofeomelaninas formadas por oxidación alcalina es adecuada dentro de un amplio margen de concentración, ya que la cantidad de producto que se forma es directamente correlacionable con la cantidad de materia prima empleada siguiendo la ley de Lambert-Beer. Empleando plumas de tres especies de aves de muy distinto contenido melánico en la figura 6 se puede observar que el procedimiento de medida correlaciona perfectamente el contenido en melanina con el peso de la pluma. Igualmente, la metodología muestra una muy aceptable repetibilidad (Tabla 3). Se emplean plumas de las tres mismas especies usadas para el estudio de linealidad en la medida y se obtiene que, al igual que en el caso de feomelaninas, dependiendo de la muestra, este porcentaje puede oscilar entre un 3.74W y un 7.92%. Evidentemente, esta variabilidad entre replicados es fruto de una heterogeneidad en la materia prima empleada. En un estudio similar al efectuado con feomelaninas se encuentra que, dependiendo de la porción de pluma empleada, el contenido en eumelanina, cuantificada como pseudofeomelanina, varia, y dentro de cada porción el porcentaje de variabilidad se estrecha hasta situarse por debajo del 5% en todos los casos (Tabla 4).

TABLA 3

Reproducibilidad del proceso de extracción y cuantificación de eumelaninas en forma de pseudofeomelaninas

	Media UA/ g	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza	Porcentaje de variabilidad
Buitre Leonado	366,28	12,12	13,71	3,74
Quebrantahuesos	92,52	4,37	4,28	4,63
Elanio	499,14	40,35	39,55	7,92

TABLA 4

Variabilidad en el contenido de eumelaninas cuantificadas como pseudofeomelaninas en distintas partes de pluma de Buitre leonado

	Media UA/ g	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza	Porcentaje de variabilidad
Base	56,67	1,45	2,01	3,55
Medio	395,06	11,40	15,80	3,99
Extremo	388,01	13,52	18,74	4,83

Ejemplo 3

Obtención de pseudofeomelaninas en estado sólido

Al igual que en el caso de las feomelaninas, es posible obtener un concentrado de pseudofeomelaninas, por precipitación en medio neutro, siguiendo el mismo procedimiento de adición de HCl concentrado y posteriormente diluido hasta alcanzar un pH situado entre 6 y 7. En estas condiciones las pseudofeomelaninas forman una suspensión fina que se separa por centrifugación.

Referencias bibliográficas

- **Burtt**, E.H. 1986. An análisis of physical, physiological and optical aspects of avian colouration with emphasis on Word warblers. *Ornithol. Monogr*. 38:1-126.

- **Burtt**, E.H. and **Ichida**, J.M. 1999. Occurrence of feather degrading bateria in the plumaje of birds. *Auk* 116: 364-372.

- **Grande**, J.M., **Negro**, J.J. & **Torres**, M.J. The evolution of bird colouration. A role for feather-degrading bacteria? *Ardeola* 51: 375-383.

- Hill, G.E. & K.J. McGraw (Eds.). 2006. Bird Coloration Vol I. Mechanisms and Measurements. *Harvard University Press*. London, England.

- **Ito**, S. & **Fujita**, K. 1985. Microanalysis of eumelanin and phaeomelanin in hair and melanomas by chemical degradation and liquid chromatography. *Analyt Biochem*. 144: 527-536.

- **Ito**, S. **Wakamatsu**, K. 1994. An improved modification of permanganate oxidation that gives constant yield of pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid. *Pigment Cell Res*. 1: 141-144.

- **Jablonski**, N. 2006. The Skin. A natural history. *California University Press*.

- **Liu**, Y. *et al*. 2003. Comparison of the structural and physical properties of human hair eumelanin following enzymatic or acid/base extraction. *Pigment Cell Res*. 16:355-365.

- **McGraw**, K.J. 2006. Mechanics of melanin-based coloration. Pp. 243-294 in Bird Coloration Vol I. Mechanisms and Measurements. G.E.Hill y K.J. McGraw (Eds.). *Harvard University Press*. London, England.

- **Wakamatsu**, K. & **Ito**, 2002. Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigement Cell Res*. 15: 174-183.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de pigmentos de melaninas **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a) tratamiento inicial alcalino,

b) separación de las feomelaninas,

c) obtención del concentrado seco de eumelanina mediante lavado del precipitado y posterior centrifugación,

d) solubilización del concentrado seco de eumelanina mediante oxidación alcalina controlada en el tiempo, y

e) neutralización de las soluciones para obtener concentrados secos de feomelanina y pseudofeomelanina.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el tratamiento inicial alcalino de a) se realiza con NaOH preferentemente al 20t en agua, en un baño con sonicación, preferentemente a 60ºC, durante al menos 20 minutos, y preferentemente durante 40 minutos con agitación periódica de la muestra.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la separación de las feomelaninas de b) se realiza mediante centrifugación, preferentemente durante 15 minutos a 17500 g y 4ºC, retirándose el sobrenadante que contiene la fracción de feomelaninas solubilizadas.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el lavado para la obtención de eumelaninas en estado sólido de c) se realiza preferentemente mediante resuspensión en NaOH al 20ó y posterior centrifugación a 17500 g durante 15 minutos repitiendo la operación tres veces.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la oxidación alcalina de la fracción eumelánica precipitada de d) se realiza preferentemente mediante adición de H_2O_2 al 30% en agua al precipitado eumelánico resuspendido en NaOH al 20%, sonicación a 60ºC durante 10 minutos de la muestra, y detención de la reacción mediante adición de un antioxidante, preferentemente $HNaSO_3$ al 40% en agua.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la obtención de los concentrados sólidos de feomelanina y pseudofeomelanina de e) se realiza mediante un proceso de neutralización de las soluciones, preferentemente con HCl al 20% seguido de HCl 0.1 N, y posterior centrifugación.

7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque la materia prima utilizada consiste en plumas de ave o pelos coloreados de mamífero.

8. Procedimiento de cuantificación de melaninas **caracterizado** porque comprende la obtención de melaninas según las reivindicaciones 1 a 7 y su medida espectrofotométrica, preferentemente mediante medida de absorbancia a 450 nm restándole la obtenida a 600 nm frente a un blanco de solución acuosa de NaOH al 20%, y dividido por el peso de muestra original para expresar la concentración de eumelaninas, en forma de pseudofeomelaninas, y de feomelaninas como UA/g de materia prima.

9. Uso de las melaninas obtenidas según las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de composiciones cosméticas.

10. Uso de las melaninas según la reivindicación 9 en dónde la composición cosmética comprende alguno de los siguientes productos: maquillaje de piel, pestañas, cejas, labios o uñas, tintes para cabellos o para vello, tintes para tatuajes, o cualquier otro producto de uso cosmético.

11. Uso de las melaninas obtenidas según las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de protectores solares frente a la radiación UV.

12. Uso de las melaninas obtenidas según las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de composiciones con fines dermatológicos en enfermedades que cursen con despigmentación de la piel.

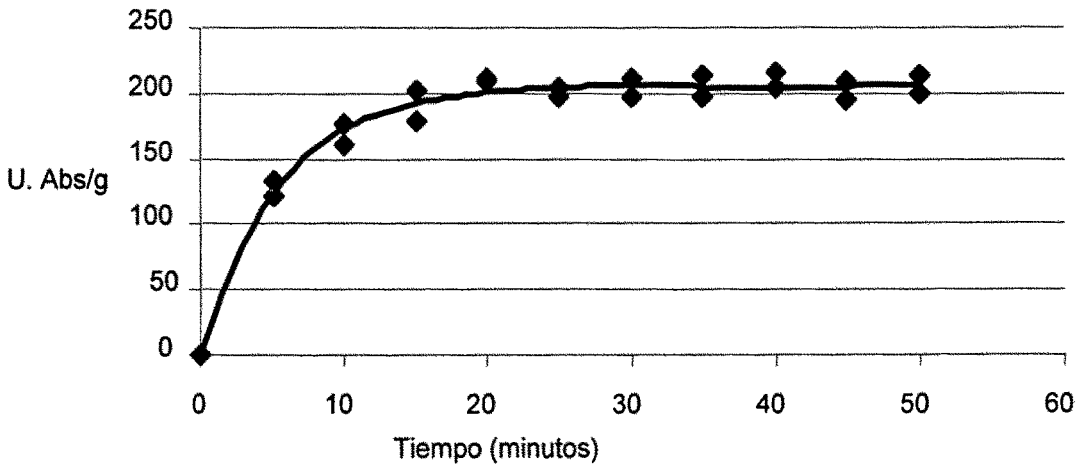

Figura 1

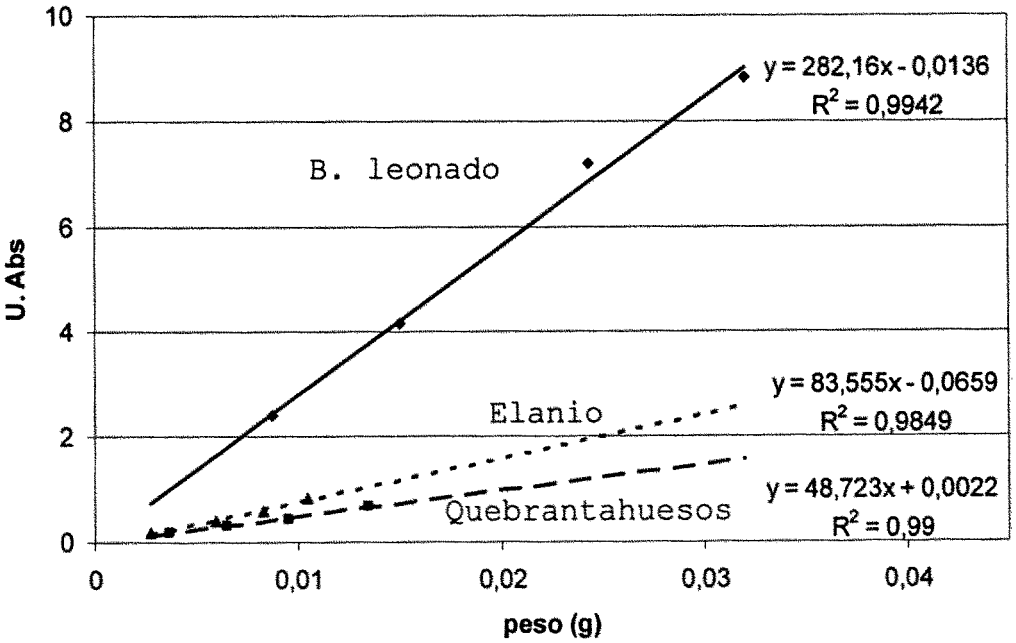
10
8
6
4
2
0
U.Abs
0
0,01
0,02
0,03
0,04
peso (g)
y = 282,16x - 0,0136
R² = 0,9942
B. leonado
y = 83,555x - 0,0659
R² = 0,9849
Elanio
y = 48,723x + 0,0022
R² = 0,99
Quebrantahuesos

Figura 2

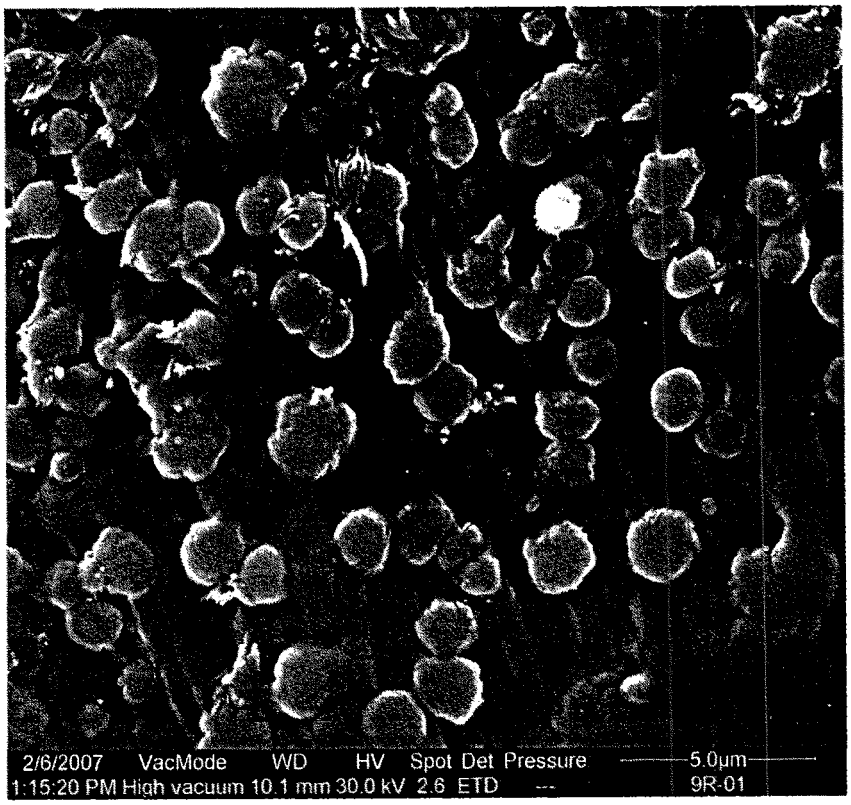
2/6/2007 VacMode WD HV Spot Det Pressure 5.0µm
1:15:20 PM High vacuum 10.1 mm 30.0 kV 2.6 ETD --- 9R-01

Figura 3

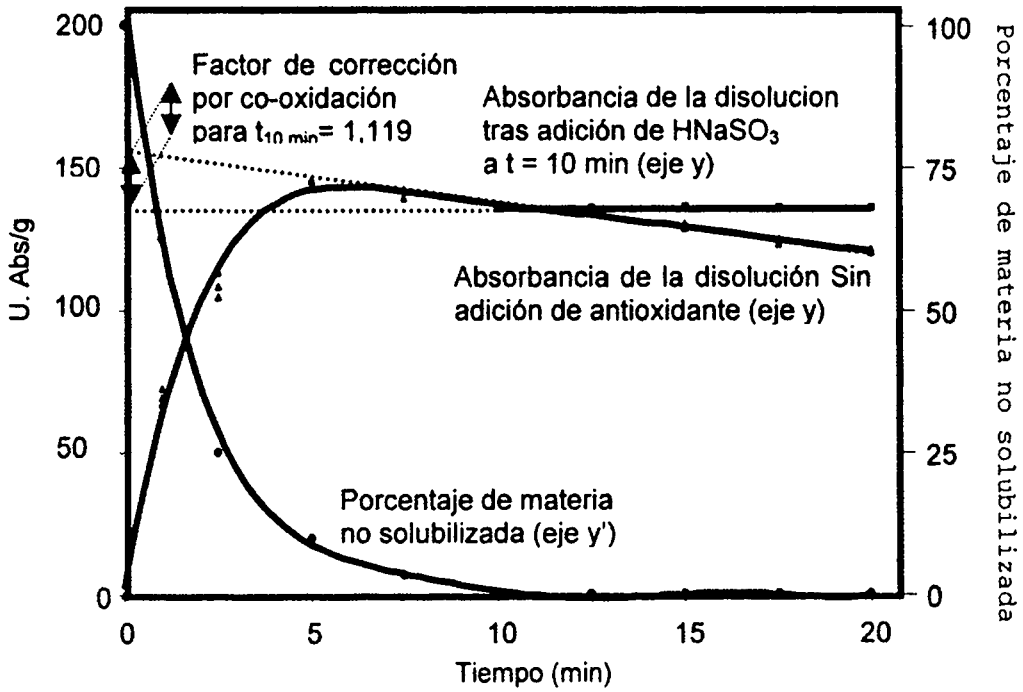
200
150
100
50
0
U. Abs/g
Factor de corrección
por co-oxidación
para $t_{10\ min}$= 1.119
Absorbancia de la disolucion
tras adición de $HNaSO_3$
a t = 10 min (eje y)
Absorbancia de la disolución Sin
adición de antioxidante (eje y)
Porcentaje de materia
no solubilizada (eje y')
0
5
10
15
20
Tiempo (min)
100
75
50
25
0
Porcentaje de materia no solubilizada

Figura 4

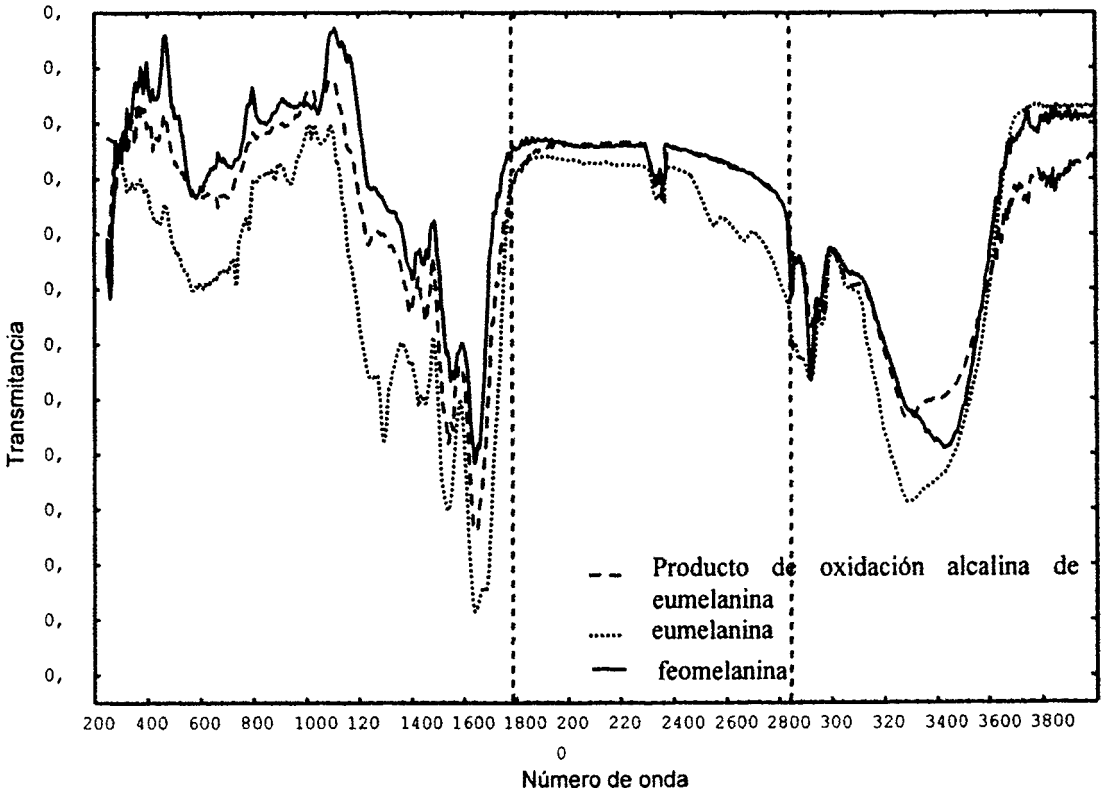
Transmitancia
0,
0,
0,
0,
0,
0,
0,
0,
0,
0,
0,
0,
0,
200 400 600 800 1000 120 1400 1600 1800 200 220 2400 2600 2800 300 320 3400 3600 3800
0
Número de onda
Producto de oxidación alcalina de eumelanina
eumelanina
feomelanina

Figura 5

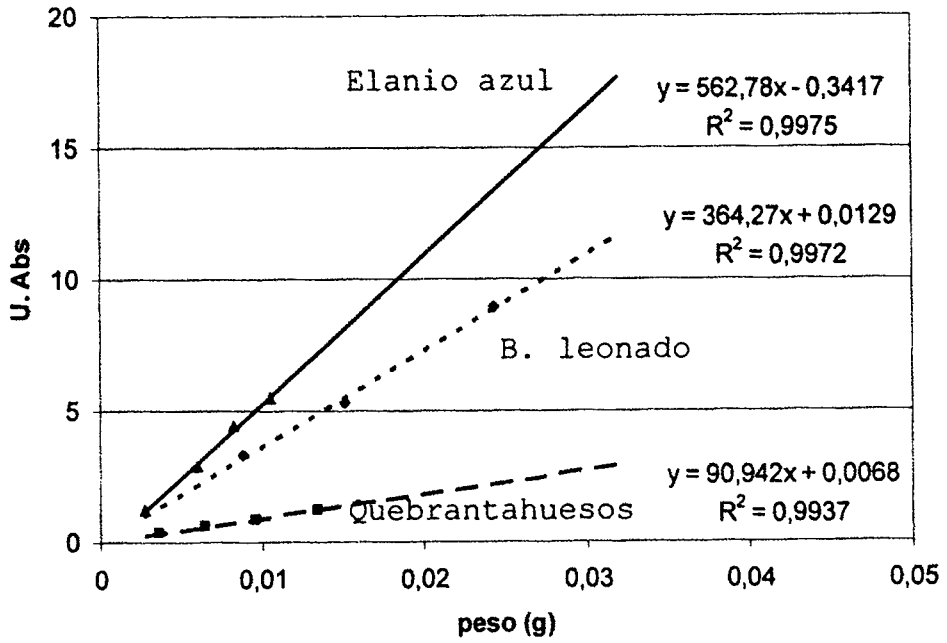
20
15
10
5
0
U. Abs
0
0,01
0,02
0,03
0,04
0,05
peso (g)
Elanio azul
y = 562,78x - 0,3417
R² = 0,9975
y = 364,27x + 0,0129
R² = 0,9972
B. leonado
y = 90,942x + 0,0068
R² = 0,9937
Quebrantahuesos

Figura 6

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 322 530

(21) Nº de solicitud: 200703395

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **21.12.2007**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KOLCZYNSKA-SZAFRANIEC, U. & BILINSKA, B. "Infrared Studies of Natural Pheomelanins". Current Topics in Biophysics, 1992, Volumen 16, Número 2, páginas 77-80. Ver página 78, columna 1.	1-8
A	GB 2203437 A (SCOPELEAD LIMITED) 19.10.1988, página 1, párrafo 1; reivindicaciones.	9-12
A	WO 2006018714 A1 (WARNER-LAMBERT COMPANY LLC) 23.02.2006, página 2, líneas 24-31.	1-8
A	NAPOLITANO, A. et al. "Microanalysis of Melanins in Mammalian Hair by Alkaline Hydrogen Peroxide Degradation: Identification of a New Structural Marker of Pheomelanin". The Journal of Investigative Dermatology, 2000, Volumen 114, Número 6, páginas 1141-1147. Ver página 1142, columna 1; página 1143, columna 1.	1-8
A	ITO, S. & WAKAMATSU, K. "Quantitative Analysis of Eumelanin i Humans, Mice, and Other Animals: a Comparative Review". Pigment Cell Research, 2003, Volumen 16, páginas 523-531. Ver página 529, Comentarios.	1-12
A	LIU, Y. et al. "Comparison of the Structural and Physical Properties of Human Hair Eumelanin Following Enzymatic or Acid/Base Extraction". Pigment Cell Research, 2003, Volumen 16, páginas 355-365. Ver página 357, Procedimientos de Extracción.	1-12
A	HAYWOOD, R.M. et al. "Synthetic melanin is a model for soluble natural eumelanin in UVA-photosensitised superoxide production". Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2006, Volumen 82, páginas 224-235. Ver página 225, Materiales y métodos.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
20.04.2009	G. Esteban García	1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C09B 61/00 (2006.01)
G01N 21/33 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 35/36 (2006.01)
A61Q 1/02 (2006.01)
A61Q 5/10 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)