

EXTRACTO VEGETAL CON ÉSTERES DE SACAROSA COMO PRINCIPIO
ACTIVO PARA SU USO EN COMPOSICIONES COSMÉTICAS,
DERMATOLÓGICAS O NUTRICOSMÉTICAS.

5

La presente invención, de interés cosmético, dermatológico y nutricosmético, consiste en un extracto vegetal obtenido del cáliz de una de las numerosas plantas de la familia de las *Solanaceae*, género *Physalis*, compuesto
10 mayoritariamente por uno o varios ésteres de sacarosa de medianamente polares a apolares con un número de carbono de los grupos acilo de C1 a C10 para su uso como principio activo en composiciones cosméticas, dermatológicas y nutricosméticas. La invención también incluye los ésteres de
15 sacarosa purificados del extracto vegetal o los ésteres de sacarosa sintetizados descritos para el mismo uso. Asimismo también incluye una composición cosmética, dermatológica o nutricosmética que tiene como principio activo extracto vegetal o ésteres de sacarosa sintetizados en un medio
20 fisiológico adecuado. La invención abarca asimismo la técnica de preparación del citado extracto vegetal.

Las composiciones cosméticas, dermatológicas y nutricosméticas están destinadas a mejorar la hidratación y la función de barrera de la epidermis, favorecer la

cicatrización, despigmentar la piel y luchar de manera preventiva y curativa contra el envejecimiento cutáneo.

La piel es un órgano vital formado por varias capas (dermis, capas proliferativas y capa córnea) que recubre toda la superficie del cuerpo y cumple básicamente una función de barrera contra el medio exterior. Esta función de barrera depende en gran medida de la calidad de la epidermis la cual depende a su vez del estado de la capa córnea (también llamada *stratum corneum*) y del equilibrio entre la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos.

Los queratinocitos son células que forman el 90% de la capa superficial de la piel (epidermis) y de las faneras (uñas, cabello, pelo). Sintetizan la queratina, una proteína fibrosa e insoluble en agua, que confiere a la piel impermeabilidad y protección exterior. La epidermis se divide en cuatro capas según la morfología de los queratinocitos, los cuales pasan progresivamente de la capa basal a las capas superiores por diferenciación celular hasta llegar a la capa córnea donde forman por apoptosis una capa de células muertas llamadas *escamas*. Esta capa crea una barrera de protección y reduce la pérdida de agua del organismo. Los queratinocitos están en continua renovación y tardan aproximadamente un mes en ir de la capa basal a la capa córnea aunque el proceso

puede verse acelerado en casos de hiperproliferación de queratinocitos (psoriasis).

La inhibición de la diferenciación de los queratinocitos es un proceso biológico que puede ser útil en el tratamiento de los signos del envejecimiento cutáneo, tanto en la función de barrera de la piel como en la formación de arrugas. Entre los activos que inhiben la diferenciación de los queratinocitos se encuentran los retinoides (retinol, ácido retinoico, entre otros). Estos elementos son reconocidos en cosmética y dermatología como eficaces principios activos que combaten numerosos problemas cutáneos, como la psoriasis, el acné y las arrugas.^{21,22} No obstante, el hecho de que los retinoides inflamen la piel ha impulsado a los laboratorios de investigación a buscar nuevos activos similares que inhiban la diferenciación de los queratinocitos y no sean inflamatorios.²³

Los fibroblastos (también llamados "células de sostén") son las células propias del tejido conjuntivo y residen básicamente en la dermis a la que proporcionan estabilidad y flexibilidad. Secretan proteoglicanos y glicoproteínas, además de colágeno, elastina y fibrilinas, entre ellas la fibrilina 1.

La fibrilina 1 es una glicoproteína cuya regulación no se conoce bien a día de hoy. Hasta el momento se han

identificado tres formas de fibrilina. Secretada tanto por los fibroblastos como por los queratinocitos, constituye el elemento principal de las microfibrillas en las matrices extracelulares elásticas y no elásticas. La fibrilina 1
5 participa en la formación de las fibras y sus propiedades funcionales y estructurales cumplen un papel esencial para la elasticidad del tejido conjuntivo, sobre todo a nivel de la unión dermoepidérmica gracias a que permite el anclaje de las células de la epidermis en las fibras elásticas de la dermis.

10 A nivel de la dermis, se observa con la edad una disminución de la actividad de los fibroblastos con un descenso de su proliferación, de la biosíntesis y de los intercambios con la matriz extracelular, así como una alteración cuantitativa y cualitativa de las fibras de
15 sostén.

 En la unión dermoepidérmica aparece un aplanamiento que entraña la pérdida de cohesión entre ambas capas (dermis y epidermis), con disminución de los elementos de la dermis y de las fibras de anclaje, lo que provoca una reducción de los
20 intercambios metabólicos y la formación de arrugas. Las estrías son el resultado de una distensión excesivamente rápida e intensa de la piel, lo que daña las células fibroblásticas y se asocia a una alteración importante del tejido colagénico y de las glicoproteínas estructurales.

Parece que la formación de estrías se debe a una alteración del metabolismo de los fibroblastos que deriva en una cicatrización deficiente y en una ruptura de contacto entre las células y la matriz, tal y como se recoge en la patente
5 WO 2001007006²⁰.

Con frecuencia se cita a la fibrilina 1, junto con la elastina, como la proteína responsable de la firmeza y la elasticidad^{9,10} y beneficiosa por su efecto antiedad^{11, 12, 13, 14, 15}. Esta proteína se emplea como bioindicador de la
10 aceleración del envejecimiento por efecto de los rayos ultravioleta^{16,17,18} y para el tratamiento de algunos procesos de cicatrización, como en el caso de las estrías. Así, la activación de la síntesis de la fibrilina 1 permitiría tratar extrínseca o intrínsecamente pieles envejecidas (programación
15 genética o cronológica) por estrés oxidativo como el provocado por los rayos ultravioleta, el tabaco o la contaminación, así como tratar cicatrices.

Los fibroblastos y los queratinocitos cumplen por tanto un papel primordial en el proceso biológico de la piel,
20 al segregar la fibrilina 1, que es la proteína responsable de firmeza, elasticidad y cohesión celular, y clave en el proceso de cicatrización y de envejecimiento de la piel.

Con el envejecimiento cutáneo la piel se vuelve seca. De ahí que en sujetos de edad avanzada (más de 50 años) se

constate a menudo una xerosis o sequedad de las mucosas asociada a una menor secreción de sebo, a cambios hormonales o a la ralentización del flujo hídrico a través de la epidermis. La piel presenta entonces comezón y tirantez, 5 síntomas característicos de una piel seca. Entre las patologías adquiridas que provocan sequedad en la piel, podríamos citar la xerosis inducida por la foto-quimioterapia y el eccema. Entre las patologías adquiridas que provocan sequedad bucal o xerostomía, se encuentra el síndrome de 10 Sjogren o la radioterapia del cuello. Y por último, entre las patologías que cursan con sequedad de las mucosas citaremos la sequedad ocular o vaginal.

Para paliar estos problemas de sequedad y envejecimiento de la piel, suelen aplicarse por vía tópica 15 productos destinados a restaurar la barrera cutánea, entre ellos: agentes humectantes, agentes filmógenos, moléculas de tipo retinoide y agentes capaces de reconstruir la barrera cutánea como, por ejemplo, el escualeno.

La presente invención consiste básicamente en el 20 descubrimiento de que un determinado tipo de sucroésteres, presentes en determinados extractos vegetales o sintetizados, presentan actividades bioquímicas y biológicas interesantes para la piel, las faneras y las mucosas; en concreto: mejoran la hidratación y la función de barrera de la epidermis, y

previenen o combaten los signos del envejecimiento cutáneo.

Los sucroésteres son acilésteres formados por uno o varios grupos acilo con un número de carbono más o menos importante (de entre C1 y C22 por ejemplo) y un azúcar. Como
5 el azúcar suele ser sacarosa, se habla entonces de ésteres de sacarosa o sucroésteres. Los sucroésteres poseen una naturaleza anfifílica que puede modularse según el grado de esterificación del azúcar y la naturaleza de los grupos acilo.

10 Al ser inocuos, insaboros, inodoros y no iónicos, los sucroésteres aportan una solución alternativa al sector de los tensioactivos. En efecto, los sucroésteres tienen diversas aplicaciones como tensioactivos, siendo utilizados en agroalimentación, detergentes, cosmética y farmacia.

15 Los sucroésteres que se encuentran en el mercado suelen ser sintéticos, si bien se están desarrollando nuevos métodos de biosíntesis para hallar técnicas más respetuosas con el medio ambiente y un producto 100% natural.^{1,2} También existen sucroésteres naturales, pero son mal conocidos en la
20 industria. En efecto, se sabe que la familia de las *Solanaceae*, cuyos representantes más conocidos son *Nicotiana tabacum* (el tabaco) y *Solanum lycopersicum* (el tomate), sintetizan y almacenan sucroésteres en sus tricomas, medios de defensa contra posibles depredadores.^{3,4}

En sus investigaciones sobre ésteres de sacarosa naturales, los laboratorios de investigación se han planteado el uso de estas moléculas como activos terapéuticos. Los ésteres de sacarosa poseen actividades biológicas (son
5 antibacterianos, antiinflamatorios, antiparasitarios) y pueden inhibir la multirresistencia a los medicamentos.^{5,6} A diferencia de los ésteres de sacarosa sintéticos, los grupos acilo de ésteres de sacarosa naturales pueden ser también aromáticos (benzoato...).⁷ Estos ésteres de sacarosa aromáticos
10 son objeto de numerosos estudios en quimioterapia como agentes antitumorales.⁸

El artículo EP 0 280 413 describe el uso de ésteres de sacarosa para aumentar la penetración de activos biológicos a través de la piel. Estos ésteres de sacarosa,
15 obtenidos por síntesis, son la sacarosa monolaurata o alternativamente la mezcla de sacarosa con ácidos grasos de nuez de coco cuyo ácido graso mayoritario es el ácido láurico (C12).

El artículo JP61271205 sostiene que algunos ésteres
20 de glucosa sintéticos de cadenas muy largas (superiores a 22 carbonos) combinados con glucosilceramida o ceramida son útiles para mejorar la humectabilidad, la flexibilidad y la elasticidad de la piel.

El artículo JP 2001 122731 expone que un extracto de

planta (sin indicar ni la planta ni la parte de la misma) es útil en cosmética para remediar la sequedad de la piel y como detergente. Como los solventes citados para obtener la extracción son esencialmente polares, permiten extraer
5 moléculas polares.

El artículo JP 2011 051920 describe el uso de un extracto de *Physalis peruviana* para blanquear la piel y atenuar las manchas de envejecimiento. En este documento se utiliza el fruto de *Physalis peruviana*.

10 El artículo de Franco L A et al. , «Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L», Biomedica, vol. 27, de 1 de enero 2007, propone una técnica de extracción a partir del cáliz de *Physalis peruviana* para obtener una actividad
15 antiinflamatoria del citado extracto.

El artículo de E.M Taleo Barrientos et al., «Anti-inflammatory effect of the ether extract and major fraction of *Physalis peruviana* calyces in acute TNBS-induced colitis», *Abstract of the 6th European Congress of pharmacology, 2012*,
20 expone una técnica de obtención de un extracto a partir del cáliz de *Physalis peruviana* con el objetivo de demostrar que dos nuevos ésteres de sacarosa presentan actividad antiinflamatoria a nivel del colon.

El artículo FR 2 896 155 defiende el uso del extracto

de *Physalis*, en concreto *alkenkegi*, como de interés cosmético contra el envejecimiento. Dado que la técnica para extraer moléculas activas es de tipo hidrófila y polar, las moléculas extraídas polares, en concreto: polifenoles, whitanolidas y azúcares.

El artículo de Desai N B et al., «*Sucrose esters - an interesting class of substances for cosmetics*», *Parfumerie und kosmetik*, *Huethig, Heidelberg, DE*, vol.66, N°10, 1 de enero de 1985, da a conocer ésteres de sacarosa sintéticos que son de interés como productos cosméticos. La tabla 1 recoge ésteres de sacarosa con un número de carbono de grupos acilo de entre C12 y C18. Estos ésteres de sacarosa se consideran hidratantes, alisantes y antiirritantes y permiten obtener productos desmaquillantes no irritantes para cosmética y farmacia.

Además de sus propiedades tensioactivas y terapéuticas (antibacteriana, antiinflamatoria y antiparasitaria), hasta ahora no se ha descrito que los ésteres de sacarosa de medianamente polares a apolares con un número de carbono de los grupos acilo de C1 a C10 posean actividad cosmética, dermatológica o nutricosmética sobre la piel, las mucosas o las faneras.

En concreto, los inventores han demostrado que

algunos ésteres de sacarosa entre medianamente polares y apolares tomados de un extracto vegetal presentan actividad biológica al activar la fibrilina 1 e inhibir la diferenciación de los queratinocitos. De manera sorprendente, los citados ésteres de sacarosa han demostrado además tener actividad biológica en varios objetivos biológicos, como el colágeno I, III y IV, la elastina, la fibrilina-1, la involucrina, la melanina y la filagrina.

Así, los autores de la presente invención han descubierto un nuevo y sorprendente principio activo de origen vegetal capaz de activar varios objetivos biológicos asociados al envejecimiento, a la hidratación y a la despigmentación. Los inventores han descubierto que este nuevo principio activo de origen vegetal es capaz de activar la síntesis de la fibrilina 1 por los fibroblastos y los queratinocitos, inhibir la diferenciación de los queratinocitos y actuar biológicamente en varios objetivos biológicos como el colágeno I, III y IV, la elastina, la fibrilina-1, la involucrina, la melanina y la filagrina, proporcionando los siguientes beneficios: mejora el aspecto de la piel, las mucosas y las faneras; previene o combate los signos de envejecimiento cutáneo intrínseco y/o extrínseco; contribuye al proceso de cicatrización (sobre todo de

estrias); previene o combate la sequedad de la piel, de las mucosas y de las faneras; y despigmenta la piel.

Terminología empleada en la presente invención:

- 5 ✓ «cantidad eficaz de principio activo»: cantidad de moléculas activas necesaria para obtener el resultado buscado, esto es, permitir obtener una actividad biológica en la piel, las faneras y/o las mucosas.
- 10 ✓ «cantidad eficaz de extracto vegetal» o «cantidad eficaz de ésteres de sacarosa»: estas expresiones, tal y como se emplean en el presente documento, se entenderán sabiendo que el extracto vegetal de la invención se compone básicamente de ésteres de sacarosa como principio activo.
- 15 ✓ «principio activo»: uno o varios ésteres de sacarosa; también puede ser un extracto vegetal formado básicamente por uno o varios ésteres de sacarosa.
- 20 ✓ «uso tópico»: acción de aplicar o extender el principio activo de la invención, o una composición que lo contenga, sobre la superficie de la piel, las mucosas o las faneras.
- ✓ «cosméticamente o dermatológicamente aceptable»: expresión que indica que el principio activo de la invención, o una composición que lo contenga, puede

entrar en contacto con la piel o las mucosas sin provocar reacciones de toxicidad o intolerancia.

- 5 ✓ «fisiológicamente adecuado/a o aceptable»: expresión que indica que las composiciones son adecuadas para uso tópico o transdérmico, en contacto con las mucosas, las faneras (uñas, cabello, pelo), el cuero cabelludo o la piel de los mamíferos, en concreto, los humanos; o bien que las composiciones pueden ingerirse o inyectarse en la piel sin riesgo de
- 10 toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad ni respuesta alérgica.
- 15 ✓ «medio fisiológicamente adaptado o aceptable» (también llamado "excipiente adecuado"): solución acuosa o hidroalcohólica, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, microemulsión, gel acuoso, gel anhidro, sérum, dispersión de vesículas o polvo, entre otros. El medio fisiológicamente aceptable es lo que normalmente se conoce con el nombre de *excipiente* de la composición.
- 20 ✓ «biológicamente activo», «que posee una actividad *in vivo* o *in vitro* característica de la actividad del principio activo de la invención».
- ✓ «signos de envejecimiento»: cualquier alteración del aspecto exterior de la piel y las faneras debidas al

- envejecimiento como, por ejemplo, arrugas y líneas de expresión, piel ajada, piel flácida, piel afinada, falta de elasticidad y/o de tonicidad de la piel, piel apagada y sin brillo, manchas de pigmentación, decoloración de los cabellos o manchas en las uñas, así como cualquier otra alteración interna de la piel que no se manifieste sistemáticamente en el exterior como, por ejemplo, los daños internos a causa de la exposición a la radiación ultravioleta (UV).
- 5
- 10 ✓ "compuesto mayoritariamente por": significa que los ésteres de sacarosa obtenidos por extracción de una matriz vegetal estén presentes en el extracto vegetal en proporción mayoritaria, es decir, pueden representar más del 50% del peso, preferentemente más
- 15 del 80% o más preferentemente aún entre el 90% y el 100%.
- ✓ «ésteres de sacarosa sintetizados»: cualquier forma de obtener ésteres de sacarosa por hemisíntesis o síntesis, ya sea síntesis química, bioquímica o
- 20 biotecnológica.

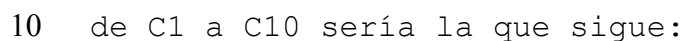
El primer objeto de la invención es un extracto vegetal obtenido del cáliz de una de las numerosas plantas de la familia de las *Solanaceae*, género *Physalis*, compuesto

mayoritariamente por uno o varios ésteres de sacarosa de medianamente polares a apolares con un número de carbono de los grupos acilo de C1 a C10 para su uso como principio biológicamente activo en la piel, las faneras y las mucosas.

5 Preferentemente la invención consiste en un extracto vegetal obtenido del cáliz de una de las numerosas plantas de la familia de las *Solanaceae*, género *Physalis*, compuesto mayoritariamente por uno o varios ésteres de sacarosa de medianamente polares a apolares con un número de carbono de
10 los grupos acilo de C1 a C10 para su uso como principio biológicamente activo en la piel, las faneras y las mucosas, sin presentar actividad antiinflamatoria.

 Está actividad biológica permite en concreto mejorar el aspecto de la piel, las mucosas y las faneras; prevenir o
15 combatir los signos del envejecimiento cutáneo externos y/o internos; ayudar al proceso de cicatrización (especialmente de estrías); prevenir y/o combatir la sequedad de la piel, las mucosas o las faneras; y despigmentar la piel.

20 En un modo de realización preferente, la fórmula general de uno o varios ésteres de sacarosa de medianamente polares a



Los ésteres de sacarosa de medianamente polares a apolares con un número de carbono de grupos acilo de C1 a C10 como el descrito en la fórmula general están presentes en el extracto vegetal en una proporción de entre el 50 al 100% del peso del extracto total, preferentemente de 80 a 100% y más preferentemente aún del 100% del peso. Estas cantidades se basan en los ejemplos 1, 2 y 3 que han permitido testar la actividad biológica de los ésteres de sacarosa contenidos en el extracto vegetal objeto de la invención.

Como se indica en los siguientes ejemplos, es posible obtener un extracto vegetal compuesto por entre un 80 y un 100% de ésteres de sacarosa de medianamente polares a apolares con un número de carbono de grupos acilo de C1 a

C10. También es posible separar los distintos ésteres de sacarosa obtenidos para lograr un extracto purificado de un solo éster de sacarosa, como se describe arriba.

5 En el modo de realización preferente según la invención, el extracto vegetal comprende uno o varios de los ésteres de sacarosa siguientes:

- el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil(1 $\rightarrow$ 2)-3,4-bis(2-metilpropanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranosido,
- 10 - el 3-O-(3-metil-1-oxobutil)- β -D-fructofuranosil(1 $\rightarrow$ 2)-3,4-bis(2-metilpropanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranosido,
- el 3-O-(3-metil-1-oxobutil)- β -D-fructofuranosil(1 $\rightarrow$ 2)-3-(2-metilpropanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranosido,
- el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil(1 $\rightarrow$ 2)-3,6-bis(2-metilpropanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranosido,
- 15 - el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil(1 $\rightarrow$ 2)-3-(3-metilbutanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranosido,
- el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil(1 $\rightarrow$ 2)-3,4-bis(2-metilpropanoato)-2-nonanoato- α -D-glucopiranosido,
- 20 - el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil(1 $\rightarrow$ 2)-3,4-bis(2-metilpropanoato)-2-octanoato- α -D-glucopiranosido.

En el modo de realización más preferente aún según la invención, el extracto vegetal comprende uno o varios de los

ésteres de sacarosa siguientes:

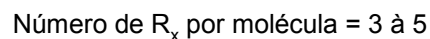
- el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil(1 $\rightarrow$ 2)-3,4-bis(2-metil propanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranósido,
- 5 - el 3-O-(3-metil-1-oxobutil)- β -D-fructofuranosil(1 $\rightarrow$ 2)-3,4-bis(2-metilpropanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranósido,

En el modo de realización preferente según la
10 invención, el extracto vegetal se obtiene del cáliz de *Physalis peruviana*.

Un segundo objeto de la invención son los ésteres de sacarosa de medianamente polares a apolares con un número de
15 carbono de los grupos acilo de C1 a C10 obtenidos del extracto vegetal de la invención o sintetizados, para su uso como principio biológicamente activo en la piel, las faneras y las mucosas.

En el modo de realización preferente, la invención
20 tiene que ver con ésteres de sacarosa de medianamente polares a apolares con un número de carbono de los grupos acilo de C1 a C10 obtenidos del extracto vegetal de la invención o sintetizados, para su uso como principio biológicamente activo en la piel, las faneras y las mucosas, sin presentar

5 C10 sería la que sigue:



En efecto, los ésteres de sacarosa entre medianamente polares y apolares con un número de carbono de grupos acilo de C1 a C10, útiles como principio activo en composiciones cosméticas, dermatológicas y nutricosméticas, pueden obtenerse:

- bien extrayéndolos del cáliz de una de las

numerosas plantas de la familia de las *Solanaceae*, del género *Physalis*. Con esta técnica se obtiene un extracto compuesto mayoritariamente por una mezcla de ésteres de sacarosa entre medianamente polares y apolares con un número de carbono de grupos acilo de C1 a C10, o una vez purificados, una cantidad
5 de un solo éster de sacarosa entre medianamente polar y apolar con un número de carbono de los grupos acilo de C1 a C10;

- bien sintetizando uno o varios ésteres de sacarosa
10 entre medianamente polares y apolares con un número de carbono de los grupos acilo de C1 a C10, como se describen. Un experto es capaz de sintetizar individualmente los ésteres de sacarosa en las distintas maneras conocidas para constituir un principio activo a base de los ésteres de
15 sacarosa según la invención.

Los ésteres de sacarosa de medianamente polares y apolares con un número de carbono de los grupos acilo de C1 a C10 son acilésteres formados por uno o varios grupos acilo con un número de carbono de entre C1 y C10, y por una
20 sacarosa.

Un tercer objeto de la invención es una composición cosmética, dermatológica o nutricosmética que tiene como principio activo el extracto vegetal de la invención o

ésteres de sacarosa sintetizados según la invención.

La composición de la invención puede formularse en diferentes preparaciones aptas para la administración tópica, oral, rectal, vaginal, nasal, auricular, bronquial o
5 parenteral.

En la primera variante, las distintas preparaciones se destinan a la administración tópica e incluyen cremas, emulsiones, leches, pomadas, lociones, aceites, soluciones acuosas, hidroalcohólicas o glicólicas, polvos, parches,
10 espráis o cualquier otro producto de aplicación externa.

En una segunda variante, las distintas preparaciones se han adaptado a la administración oral toda vez que el extracto vegetal que incluye los ésteres de sacarosa puede incorporarse a una composición alimentaria o a un suplemento
15 alimentario. El suplemento alimentario puede presentarse en forma de cápsulas duras o blandas de gelatina o vegetales en el marco de la presente invención y podría contener el extracto vegetal en una proporción de entre el 0,01 y el 100% de su peso.

20 Para uso cosmético o dermatológico, la composición se formulará en forma de preparación destinada a administración tópica.

Para uso alimentario, con fines nutritivos o cosméticos (*cosmeto-food* o nutricosmética o nutracosmética),

la composición se formulará en preparación destinada a la administración oral. Podría no incluir excipiente y estar formada íntegramente por el extracto vegetal compuesto mayoritariamente por ésteres de sacarosa o ésteres de 5 sacarosa sintetizados, conforme a la fórmula general antes indicada.

Las composiciones según la invención están destinadas específicamente a la administración por vía tópica. De ahí que deban contener un medio cosmético y/o dermatológicamente 10 aceptable, es decir, compatible con la piel y las faneras, pudiendo presentarse en todas las formas cosméticas o dermatológicas. En concreto, estas composiciones pueden presentarse en forma de cremas, emulsiones de aceite en agua, de agua en aceite o múltiples, soluciones, suspensiones, 15 geles, leches, lociones, barritas o incluso polvos, todas ellas adaptadas a la aplicación sobre la piel, los labios o las faneras. Estas composiciones incluyen los excipientes necesarios para su formulación, como solventes, espesantes, diluyentes, tensioactivos, antioxidantes, colorantes, 20 conservantes y aromas, y pueden utilizarse como producto de tratamiento y/o como producto de maquillaje.

La composición objeto de la invención puede destinarse también a productos de cuidado capilar (champús, acondicionadores, lociones tratantes, cremas o geles de

peinado, lociones reestructurantes para el cabello, mascarillas, etc.). La composición cosmética objeto de la invención puede utilizarse en tratamientos que implican una aplicación seguida o no de un aclarado o incluso en forma de champú. Asimismo la composición objeto de la invención puede emplearse eficazmente en tratamientos anticaspa. También puede presentarse en forma de tinte o de mascarilla para aplicar con pincel o con peine, en cejas, pestañas o cabello.

Las composiciones objeto de la invención pueden incluir, además, cualquier aditivo comúnmente utilizado en el campo de aplicación previsto así como los adyuvantes necesarios para su formulación: solventes, espesantes, diluyentes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, agentes autobronceantes, pigmentos, rellenos, conservantes, perfumes, absorbentes de olor, activos cosméticos o farmacéuticos, aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos esenciales, tensioactivos, polímeros filmógenos, etc.

El *INCI Dictionary & Handbook* ("International Nomenclature of Cosmetic Ingredients 13.^a Ed. 2010) publicado por "the Personal Care Products Council, Inc.", Washington, D.C.) describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos comúnmente utilizados en la industria cosmética que son idóneos para su uso como aditivos en las composiciones objeto de la presente invención.

Entre los ejemplos de este tipo de ingredientes se incluyen, sin carácter limitativo: los agentes cicatrizantes, los agentes antiedad, los agentes antiarrugas, los agentes antiatrofia, los agentes hidratantes, los agentes suavizantes, los agentes antibacterianos, los agentes antiparasitarios, los agentes antifúngicos, los agentes fungicidas, los agentes fungiestáticos, los agentes bactericidas, los agentes bacterioestáticos, los agentes antimicrobianos, los agentes antiinflamatorios, los agentes antipruriginosos, los agentes anestésicos, los agentes antivirales, los agentes queratolíticos, los agentes antirradicales libres, los agentes antiseborreicos, los agentes anticaspa, los agentes que inhiben la diferenciación, la proliferación o la pigmentación cutánea, los agentes aceleradores de penetración, los agentes descamantes, los agentes estimulantes o inhibidores de la síntesis de melanina, los agentes blanqueantes, despigmentantes o aclarantes, los agentes propigmentantes, los agentes antibronceantes, los agentes inhibidores de NO-sintasa, los agentes antioxidantes, los agentes captadores de radicales libres y/o antipolución atmosférica, los agentes antiglicación, los agentes reafirmantes, los agentes que estimulan la síntesis de las macromoléculas dérmicas o epidérmicas, los agentes capaces de prevenir o inhibir su

deterioro, los agentes que estimulan la síntesis de colágeno, los agentes que estimulan la síntesis de elastina, los agentes que estimulan la síntesis de decorina, los agentes que estimulan la síntesis de laminina, los agentes que estimulan la síntesis de chaperón, los agentes que estimulan la síntesis de acuaporina, los agentes que estimulan la síntesis de ácido hialurónico, los agentes que estimulan la síntesis de lípidos y de componentes de la capa córnea (ceramidas, ácidos grasos...), los agentes que inhiben el deterioro del colágeno, los agentes que inhiben el deterioro de la elastina, los agentes que estimulan la proliferación de fibroblastos, los agentes que estimulan la proliferación de queratinocitos, los agentes que estimulan la proliferación de adipocitos, los agentes que estimulan la proliferación de melanocitos, los agentes que estimulan la diferenciación de queratinocitos, los agentes que estimulan la diferenciación de adipocitos, los agentes que inhiben la acetilcolinesterasa, los agentes que estimulan la síntesis de glicosaminoglicanos, los agentes que reparan el ADN, los agentes que protegen el ADN, los agentes antiprurito, los agentes de tratamiento y/o cuidado de la piel sensible, los agentes reafirmantes, los agentes antiestrías, los agentes astringentes, los agentes que regulan la producción de sebo, los agentes dermorrelajantes, los agentes adyuvantes de la

curación, los agentes que estimulan la reepitelización, los
agentes adyuvantes de la reepitelización, los factores de
crecimiento de la citoquina, los agentes calmantes, los
agentes antiinflamatorios, los agentes que actúan en la
5 circulación y/o microcirculación capilar, los agentes que
estimulan la angiogénesis, los agentes que inhiben la
permeabilidad vascular, los agentes que actúan sobre el
metabolismo celular, los agentes destinados a mejorar la
unión dermoepidérmica, los agentes que estimulan el
10 crecimiento del cabello o el vello, los agentes que inhiben o
retardan el crecimiento del cabello o el vello, los agentes
relajantes musculares, los agentes anticontaminación y/o
antirradicales libres, los agentes que estimulan la
lipólisis, los agentes adelgazantes, los agentes
15 anticelulitis, los agentes que actúan sobre la
microcirculación, los agentes que actúan sobre el metabolismo
de las células, los agentes limpiadores, los agentes de
peinado del cabello, los estimulantes de crecimiento del
cabello, los protectores solares, los protectores totales,
20 los agentes maquilladores, los detergentes, los productos
farmacéuticos, los agentes emulsificantes, los emolientes,
los disolventes orgánicos, los agentes antisépticos, los
activos desodorantes, los medios fisiológicamente aceptables,
los surfactantes, los agentes abrasivos, los absorbentes, los

componentes estéticos como perfumes, pigmentos, tintes, colorantes artificiales o naturales, los aceites esenciales, los agentes táctiles, los astringentes cosméticos, los agentes antiacné, los agentes anticoagulación, los agentes antiespuma, los antioxidantes, los ligantes, los aditivos biológicos, las enzimas, los inhibidores enzimáticos, los inductores enzimáticos, las coenzimas, los agentes quelantes, los extractos vegetales y derivados de plantas, los aceites esenciales, los extractos marinos, los agentes obtenidos de procedimientos de biofermentación y/o de biotecnología, las sales minerales, los extractos celulares, los protectores solares (los agentes fotoprotectores orgánicos o minerales que protegen de la radiación ultravioleta A y B), las ceramidas, los péptidos, los tampones, los agentes de volumen, los agentes quelantes, los aditivos químicos, los colorantes, los biocidas cosméticos, los desnaturalizantes, los astringentes medicinales, los analgésicos externos, los agentes filmógenos, como los polímeros para potenciar las propiedades filmogénas y la sustentividad de la composición, los derivados cuaternarios, los agentes que aumentan la sustentividad, los agentes opacificantes, los ajustadores y reguladores de pH (como la trietanolamina), los propelantes, los agentes reductores, los sequestrantes, los agentes decolorantes y/o aclarantes de la piel, los agentes

acondicionadores de la piel (humectantes, incluyendo misceláneos y oclusivos), las sustancias que retienen la humedad, los alfa-hidroxiácidos, los beta-hidroxiácidos, los hidrantes, las enzimas hidrolíticas epidérmicas, los agentes
5 calmantes y cicatrizantes, los agentes tratantes de la piel, los agentes antiarrugas, los agentes capaces de reducir o tratar las bolsas de los ojos, los agentes exfoliantes, los espesantes, los suavizantes, los polímeros gelificantes, las vitaminas y sus derivados, los agentes humectantes, los
10 agentes de *peeling*, los agentes calmantes, los agentes curativos de la piel, los lignanos, los conservadores (fenoxietanol y parabenos), los antiUV, los agentes citotóxicos, los antineoplásicos, los agentes modificantes de la viscosidad, los disolventes no volátiles, los agentes
15 perlantes, los agentes antitranspirantes, los depilatorios, las vacunas, el agua perfumada, agentes reestructurantes de la piel, los excipientes, los rellenos, los minerales, los agentes antimicobacterianos, los agentes antialérgicos, los antihistamínicos H1 o H2, los antiirritantes, los agentes que
20 estimulan el sistema inmunitario, los agentes que inhiben el sistema inmunitario, los repelentes de insectos, los lubricantes, pigmentantes o colorantes, los agentes hipopigmentantes, y los agentes fotoestabilizantes y sus mezclas, siempre que sean física y químicamente compatibles

con los demás ingredientes de la composición y sobre todo, con los activos de esta invención.

Se vigilará, no obstante, que la naturaleza de los ingredientes adicionales no altere de manera inaceptable los beneficios de los activos de la invención. Estos ingredientes pueden ser sintéticos o naturales (por ejemplo, extractos de plantas) o haberse obtenido con técnicas de biofermentación. En el *INCI Dictionary & Handbook* pueden encontrarse más ejemplos.

Los citados ingredientes pueden seleccionarse del grupo que comprende: los azúcares aminados, glucosamina, D-glucosamina, N-acetil- glucosamina, N-acetil-D-glucosamina, manosamina, N-acetil manosamina, galactosamina, N-acetil galactosamina, vitamina B3 y sus derivados, le niacinamida, el dehidroacetato de sodio, el ácido dehidroacético y sus sales, los fitosteroles, los compuestos de ácido salicílico, las hexamidinas, los compuestos de dihidroxiprolina de dialcanoil, extractos y derivados de la soja, ecuol, isoflavonas, flavonoides, fitantriol, farnesol, geraniol, bisabolol, péptidos y sus derivados, di -, tri -, tetra -, penta - y hexapéptidos y sus derivados, lis-tr-tr-lis-ser, palmitoil-lis-tr-tr-lis-ser, carnosina, compuestos de ácido aminado N-acil, retinoides, propionato de retinil, retinol, palmitato de retinil, acetato de retinil, retinal, ácido

retinoico, vitaminas hidrosolubles, ascorbatos, vitamina C, ascorbil glucósido, palmitato ascorbilo, ascorbil fosfato de magnesio, ascorbil fosfato de sodio, vitaminas y sus sales y derivados, provitaminas y sus sales y derivados, etil

5 pantenol, vitamina B y sus derivados, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina K y sus derivados, ácido pantoténico y sus derivados, éter etílico de pantotenil, pantenol y sus derivados, pantenol etílico, dexpantenol, biotina, ácidos aminados y sus sales y sus

10 derivados, ácidos aminados hidrosolubles, asparagina, alanina, indol, ácido glutámico, vitaminas insolubles en agua, vitamina A, vitamina E, vitamina F , vitamina D y sus compuestos, mono-, di - y triterpenoides, betaionol, cedrol y sus derivados, ácidos aminados insolubles en agua, tirosina,

15 triptamina, materiales particulados, butilhidroxitolueno, hidroxibutilanisol, alantoina, nicotinato de tocoferol, tocoferol, ésteres de tocoferol, palmitoil-gli-his-lis, fitosterol, hidroxiaácidos, ácido glicólico, ácido láctico, ácido lactobiónico, quetoácidos, ácido pirúvico, ácido

20 fítico, ácido lisofosfatídico, estilbenos, cinamatos, resveratrol, quinetina, zeatina, dimetilaminoetanol, péptidos naturales, péptidos de soja, sales de azúcares ácidos, gluconato de

manganeso, gluconato de zinc, piroctona olamina, 3,4,4'-

triclorocarbanilida, triclocarbán, piritiona de zinc, hidroquinona, ácido kójico, ácido ascórbico, ascorbil fosfato de magnesio, ascorbil glucósido, poyridoxina, aloe vera, alcoholes terpénicos, alantoína, bisabolol, glicirricinato
5 dipotásico, ácido de glicerol, de sorbitol, de pentaeritritol, de pirrolidona y sus sales, dihidroxiacetona, erithulosa, gliceraldehido, tartaraldehido, esencia de clavo de olor, el mentol, el alcanfor, la esencia de eucalipto, eugenol, el lactato de mentilo, el destilato de hamamelis, el
10 copolímero de eicoseno y vinil pirrolidona, iodopropil butilcarbamato, un polisacárido, un ácido graso esencial, un salicilato, un ácido gliciretínico, carotenoides, ceramidas y pseudoceramidas, lípidos complejos, aceites naturales en general como la manteca de carité, el aceite de albaricoque,
15 el aceite de onagra, el aceite de ciruela, el aceite de palma, el aceite de monoí, el aceite de kahai, la hidroquinona, el HEPES, la procisteína, el O-octanoil-6-D-maltosa, la sal dioxídica de ácido metil-glicina-diacético, los esteroides como la diosgenina y los derivados de la DHEA,
20 la DHEA dehidroepiandrosterona y/o un precursor o derivado químico o biológico, el N-etilcarbonil-4-para-aminofenol, los extractos de arándano, las fitohormonas, los extractos de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los extractos de algas, los extractos de soja, de altramuza, de maíz o de guisante, la

alverina y sus sales, en concreto el citrato de alverina, los extractos de rusco y de castaño de indias y sus combinaciones, un inhibidor de la metaloproteinasas y los extractos de *Schinus molle*.

5 En todos los casos, el especialista deberá procurar elegir los adyuvantes y sus proporciones de manera que no mermen las propiedades beneficiosas deseadas de la composición.

10 En un modo de realización preferente según la invención, la composición cosmética, dermatológica o nutricosmética representa entre el 10^{-6} y el 50% del peso total de la composición de principio activo.

15 Una cantidad eficaz del principio activo o del extracto vegetal será aquella que obtenga el resultado buscado, a saber: mejorar la hidratación y la función de barrera de la epidermis, prevenir o luchar contra la sequedad de la piel y las mucosas, y contra los signos de envejecimiento cutáneo, estimular el proceso de cicatrización o despigmentar la piel. La actividad antiinflamatoria se
20 excluye del campo de actividades dermatológicas reevindicadas.

 Según un modo de realización beneficioso de la invención, la cantidad eficaz o el contenido de principio activo de la composición representa entre el 10^{-6} y el 25 %

del peso total de la composición, preferentemente entre un 10^{-6} y un 10 % del peso total.

Las cantidades eficaces indicadas se basan en los resultados que se detallan en los ejemplos 21 a 23. Así, en
5 función de la concentración de ésteres de sacarosa que contenga el extracto y de la dilución realizada (en su caso), la cantidad eficaz variará en las proporciones antes indicadas.

En un modo de realización más ventajoso todavía según
10 la invención, la composición cosmética se adapta a una administración tópica y se presenta en forma de solución acuosa, hidroalcohólica o aceitosa, en forma de emulsión aceite en agua, agua en aceite o múltiple o bien en forma de cremas, suspensiones o incluso polvos gracias a que la citada
15 composición puede ser más o menos fluida o sólida y presentar el aspecto propio de una crema, loción, leche, champú, sérum, pomada, gel, pasta, espuma o barrita.

Un cuarto objeto según la invención consiste en una técnica de tratamiento cosmético para mejorar el aspecto de
20 la piel, las mucosas y las faneras; para prevenir o combatir la sequedad de la piel y las mucosas; para prevenir o combatir los signos de envejecimiento cutáneo y del fotoenvejecimiento; para combatir la pérdida de elasticidad y de firmeza de la piel y para despigmentar la piel. Esta

técnica consiste en aplicar sobre la superficie de la piel y/o el cabello una cantidad eficaz de la composición cosmética objeto de la invención, antes definida.

5 Cabe destacar que la actividad despigmentante de la composición cosmética objeto de la invención inhibe la producción de la melanina.

Un quinto objeto según la invención consiste en una cantidad eficaz de un extracto vegetal según la invención o de ésteres de sacarosa sintetizados según la invención, solos
10 o combinados con otros principios activos, para su uso en el tratamiento dermatológico de las patologías que cursen con una sequedad patológica de la piel, las mucosas o las faneras o para favorecer la cicatrización.

15 En el modo de realización preferente, la invención consiste en una cantidad eficaz del extracto vegetal de la invención o de ésteres de sacarosa sintetizados según la invención, solos o combinados con otros principios activos, para su uso en el tratamiento dermatológico de las patologías
20 que cursen con sequedad patológica de la piel, las mucosas o las faneras o para favorecer la cicatrización, excluyéndose la actividad antiinflamatoria.

La cantidad eficaz también se basa en los resultados que se detallan en los ejemplos 21 a 23. Los ensayos

realizados en el colágeno III, el colágeno IV y la fibrilina-1 han revelado que la cantidad eficaz debe ser de al menos 10^{-6} % el peso del total de la composición.

Un sexto objeto de la invención consiste en el uso de una cantidad eficaz del extracto vegetal de la invención o de ésteres de sacarosa sintetizados según la invención, solos o combinados con otros principios activos, para preparar una composición nutricosmética bebible destinada a mejorar el aspecto de la piel, las mucosas y las faneras; a prevenir o luchar contra la sequedad de la piel y las mucosas; y a prevenir o combatir los signos de envejecimiento cutáneo y/o del fotoenvejecimiento.

El séptimo y último objeto de la invención es una técnica de preparación del citado extracto vegetal o principio activo compuesto mayoritariamente por uno o varios ésteres de sacarosa.

La extracción se puede realizar de una planta entera o de una parte específica de la misma (hojas, semillas, tallos, raíces, cálices, pétalos, fruto, etc.).

En esta invención, en concreto, se utiliza el cáliz de una de las numerosas plantas de la familia de las *Solanaceae*, del género *Physalis*, preferentemente la especie *peruviana*.

El especialista puede emplear cualquier método de

extracción y de purificación conocido para preparar el extracto vegetal objeto la invención de ésteres de sacarosa antes descritos con actividad biológica en la piel, las mucosas y las faneras.

5 Más adelante se describe con detalle la técnica de preparación del extracto vegetal objeto de la presente invención.

La planta o partes de la planta pueden recolectarse de la naturaleza o cultivarse a la manera convencional, sin
10 suelo por el método hidropónico.

De forma no exhaustiva, la preparación del extracto vegetal bruto puede realizarse mediante técnicas de extracción vegetal sólido/líquido más o menos convencionales, utilizando principalmente solventes orgánicos conocidos por
15 el especialista. El procedimiento de extracción puede ser por simple contacto discontinuo, semicontinuo o continuo. También puede realizarse en múltiples fases, en co-corriente o en contracorriente. Puede ser asistido por ultrasonidos, microondas, inducción termomagnética, campos eléctricos
20 pulsados o incluso bajo presión.

La matriz vegetal puede prepararse previamente por secado y después por trituración o criotrituración, por flash expansión o por expansión instantánea controlada. La matriz vegetal también puede ser digerida por enzimas al objeto de

liberar el máximo de moléculas de interés.

Los solventes que pueden emplearse para extraer los ésteres de sacarosa son los siguientes:

- hidrocarburos, alifáticos lineales o ramificados,
5 aromáticos o cíclicos como el hexano, el ciclohexano, etc.
- hidrocarburos halogenados, como el dicloroetileno, el cloroformo, etc.;
- alcoholes tales como el metanol, el etanol, el propanol,
10 el isopropanol o el butanol.
- glicoles como el etilenglicol, el propilenglicol, los 1,2 y 1,3 propanedioles, el butilenglicol, el glicerol...
- cetonas como la acetona, la metil-isobutil-cetona, la metil-etil-cetona.
- 15 - éteres alifáticos o cíclicos como el éter dietílico, el metil-terbutiléter, el etil-terbutil-éter, el tetrahidrofurano (THF), el metil THF.
- éteres de glicol como el 2-metoxi-1-metiletil acetato, el 2-(2-butoxietoxi) etanol y su acetato.
- 20 - ésteres, ácidos de cadena más o menos larga y alcoholes de cadena más o menos larga como el acetato de etilo, el lactato de etilo, el propionato de etilo, el oleato de etilo, el estearato de metilo, el oleato de oleilo.
- líquidos iónicos como el 1-(4-sulfobutil)-3-

metilimidazolio hidrogenosulfato, el 1-etil-3-

metilimidazolio bis (trifluorometanesulfonil) imida.

- fluidos supercríticos como el dióxido de carbono con o sin co-solvente;
- 5 - agrosolventes como los aceites vegetales, terpenos como el limoneno o el pineno,
- una combinación de estos disolventes.

El extracto así obtenido puede purificarse por distintos métodos, en concreto por extracción líquido-
10 líquido, por centrifugación, por adsorción (por ejemplo por decoloración con carbón activado o con tierra decolorante), por sublimación, por cristalización, por cromatografía preparativa, por destilación sobre todo molecular de tipo centrífugo, con evaporador de film o incluso por filtración
15 con membrana.

Según la técnica de purificación utilizada, podrá realizarse una etapa posterior de filtración o desolvación.

En el modo de realización preferente, el extracto vegetal bruto se obtiene con uno de los siguientes solventes:
20 ciclohexano, acetato de etilo y dióxido de carbono supercrítico a los que se añaden un co-solvente como por ejemplo un alcohol, un alcohol alifático como el etanol o un aceite vegetal, preferentemente refinado o incluso un éster como el caprilato/caprato de glicerol.

Así, la técnica de preparación de un extracto vegetal según la presente invención se dividiría en las siguientes etapas:

- secado de la parte de la planta;
- 5 - trituración;
- extracción con un solvente orgánico adecuado;
- desolvación eventual;
- purificación eventual con una o varias técnicas adecuadas.

10

En un modo de realización preferente, la técnica de la invención consta de las siguientes etapas:

- secado de la parte de la planta;
- criotrituración;
- 15 - extracción con el acetato de etilo, el ciclohexano, el etanol o el dióxido de carbono supercrítico sin o con un co-solvente como un alcohol, un aceite vegetal o un éster;
- purificación por cristalización o adsorción;
- 20 - filtración eventual; y
- desolvación eventual.

Los siguientes ejemplos, de carácter ilustrativo y no limitativo, muestran otras ventajas y características de la invención.

**Ejemplo 1: Preparación de un extracto vegetal a partir del
cáliz de *Physalis peruviana***

Los cálices de *Physalis peruviana*, previamente
5 separados del fruto y secados, se trituran en un molino de
cuchillas con una rejilla de 1 mm, que permite obtener un
polvo con un tamaño de partículas de en torno a los 500 µm.

El polvo (50 g) obtenido se coloca en un cartucho de
celulosa, que se introduce en un extractor tipo Soxhlet.

10 El solvente utilizado para la extracción es etanol al
96% (50 ml), con una veintena de ciclos de extracción.

El extracto en el medio solvente se evapora en el
rotavapor para eliminar el solvente.

Se obtiene así 11,0 g de extracto de cálices de
15 *Physalis peruviana* con un 57% de ésteres de sacarosa.

**Ejemplo 2: Preparación de un extracto vegetal a partir del
cáliz de *Physalis peruviana***

Los cálices de *Physalis peruviana*, previamente
20 separados del fruto y secados, se trituran en un molino de
cuchillas con una rejilla de 1 mm, que permite obtener un
polvo con un tamaño de partículas de en torno a los 500 µm.

El polvo obtenido (50 g) se coloca en un cartucho de
celulosa, que se introduce en un extractor tipo Soxhlet.

El solvente utilizado para la extracción es acetato de etilo con una veintena de ciclos de extracción. El extracto así obtenido en medio solvente puede purificarse por extracción líquido-líquido sobre columna con agua a una
5 temperatura comprendida entre 20°C y 65°C, a contracorriente con el fin de eliminar las moléculas hidrosolubles. A continuación se evapora la fase orgánica que comprende el acetato de etilo y el extracto con un rotavapor para eliminar el solvente.

10 El extracto lavado queda limpio de polifenoles, whitanolidas y azúcares libres.

Se obtiene así 6,2 g de extracto de cálices de *Physalis peruviana* con un 89,0% de ésteres de sacarosa.

15 **Ejemplo 3: Preparación de un extracto vegetal a partir del cáliz de *Physalis peruviana***

Los cálices de *Physalis peruviana*, previamente separados del fruto y secados, se trituran en un molino de cuchillas con una rejilla de 1 mm, que permite obtener un
20 polvo con un tamaño de partículas de en torno a los 500 µm. El polvo así obtenido (500 g) se introduce en un extractor de fluidos supercríticos.

El solvente utilizado para la extracción es dióxido de carbono al que se le ha añadido un co-solvente, por

ejemplo, un alcohol alifático como el etanol.

Los parámetros de extracción son para una presión comprendida entre 75 y 200 bares, una temperatura de entre 35 y 50°C, un caudal de CO₂ de entre 2 y 20 kg/h y 1 a 5% de etanol con respecto al CO₂.

El extracto obtenido en medio solvente se decolora con carbono activado o con tierra decolorante, se cristaliza en frío y después se filtra y se evapora.

Se obtiene así 85,5 g de extracto de cálices de *Physalis peruviana* con un 87,6% de ésteres de sacarosa.

Si es necesario, el extracto así obtenido podrá purificarse por destilación molecular de tipo centrífuga o con evaporador de film, para obtener un extracto de cálices de *Physalis peruviana* con 99,9% de pureza cromatográfica.

15

Ejemplo 4: Purificación de los ésteres de sacarosa a partir de un extracto vegetal obtenido del cáliz de *Physalis peruviana*

El extracto del cáliz de *physalis* (1 g) obtenido en el ejemplo 1 se disuelve en 6 ml de una mezcla de solvente CH₃CN/H₂O 1:1. La solución se filtra en un cartucho por Extracción en Fase Sólida (SPE) (C18, 10 g) y se aclara con 10 mL de la misma mezcla CH₃CN/H₂O 1:1.

El eluato obtenido se asocia al solvente de carga

para obtener la fracción 1 (300 mg).

El cartucho cargado se eluye sucesivamente según el gradiente de solvente CH₃CN/H₂O 7:3 (20 mL) y 1:0 (20 mL) para obtener las fracciones 2 (500 mg) y 3 (100 mg).

5 Las fracciones 1, 2 y 3 se analizan por HPLC-DAD-DEDL y se comparan en el cromatograma del extracto inicial.

La fracción 1 está compuesta por componentes polifenólicos, witanolidas y fisalinas y por componentes polares como los azúcares.

10 La fracción 2 se compone de ésteres de sacarosa.

La fracción 3 es de tipo lipídica.

La fracción 2 (500 mg) está sujeta a un fraccionamiento por HPLC preparativo (C18, 50x150 mm, 5µm) según un gradiente de solvente H₂O/CH₃CN (de 3:7 a 0:1 en 35 min.) para obtener las fracciones:

- Fracción IIIb (elución entre 4 y 14 min.),
- Fracción I (elución entre 14 y 18 min.; 230 mg),
- Fracción II (elución entre 18 y 25 min.; 200 mg) y
- Fracción IIIa (elución entre 25 y 35 min.).

20 Las fracciones IIIa y IIIb se mezclan para obtener la fracción III (50 mg).

Composición de las fracciones obtenidas:

Fracción I: Compuesto 1, 3-O-(2-metil-1-oxopropil)-β-D-fructofuranosil (1→2)-3,4-bis(2-metilpropanoato) -2-

decanoato- α -D-glucopiranosida.

Fracción II: Compuesto 2, 3-O-(3-metil-1-oxobutil)- β -D-fructofuranosil (1 $\rightarrow$ 2)-3,4-bis(2-metilpropanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranosida.

5 Fracción III: ésteres de sacarosa distintos a los anteriores y que comprenden:

- el 3-O-(3-metil-1-oxobutil)- β -D-fructofuranosil (1 $\rightarrow$ 2)-3-(2-metilpropanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranosido,
- el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil (1 $\rightarrow$ 2)-3,6-bis(2-metilpropanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranosido.
- el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil (1 $\rightarrow$ 2)-3-(3-metilbutanoato)-2-decanoato- α -D-glucopiranosido
- el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil (1 $\rightarrow$ 2)-3,4-bis(2-metilpropanoato)-2-nonanoato- α -D-glucopiranosido,
- 15 - el 3-O-(2-metil-1-oxopropil)- β -D-fructofuranosil (1 $\rightarrow$ 2)-3,4-bis(2-metilpropanoato)-2-octanoato- α -D-glucopiranosido,

Ejemplo 5: Efectos de las fracciones I, II y III en el perfil de expresión de células cutáneas

20 Los efectos de las fracciones I, II y II se han analizado por análisis transcriptómico en modelos de queratinocitos epidérmicos humanos normales y de fibroblastos dérmicos humanos. Este análisis global de expresión de transcritos se realizó tras una incubación de entre 4 y 24

utilizando la plataforma Affymetrix GeneAtlas™ y el chip «full transcriptome humain» U219 que contiene 36000 transcritos y variantes.

5

1. Modelos biológicos

Queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK)

- Tipo celular: Queratinocitos epidérmicos humanos
normales (NHEK)
- Condiciones de cultivo: 37°C, 5% CO₂
- Medio de cultivo: Queratinocito-SFM complementado con
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
0,25 ng/ml
Extracto pituitario (EP) 25 µg/ml
Gentamicina 25 µg/ml
- Medio de ensayo: Queratinocito-SFM complementado con
Gentamicina 25 µg/ml

10 - Tipo celular: Fibroblastos dérmicos humanos normales
(NHDF),

- Condiciones de 37°C, 5% CO2
cultivo:

15 - Medio de DMEM complementado con
cultivo: L-glutamina 2 mM
Penicilina 50 U/ml - Estreptomicina 50 µg/ml
Suero fetal bovino (SVF) 10%

20 - Medio de DMEM complementado con
ensayo: L-glutamina 2 mM
Penicilina 50 U/ml - Estreptomicina 50 µg/ml
SVF 1%

5

2. Compuestos testados

10

15

20

Compuesto testado	Aspecto / Almacenamiento	Solución stock	Concentración testada
Fracción I	- Pasta - Almacenamiento a +4°C	50 mg/ml en DMSO	0,8 µg/ml
Fracción II	- Pasta - Almacenamiento a +4°C	50 mg/ml en DMSO	0,8 µg/ml
Fracción III	- Pasta - Almacenamiento a +4°C	50 mg/ml en DMSO	0,8 µg/ml

3 Cultivo y tratamiento

Las células se sembraron y cultivaron en un medio de cultivo durante 24 horas y después se incubaron en su medio de ensayo durante otras 24 horas. Posteriormente se cambió el medio de ensayo por otro que contiene o no (control) los componentes del ensayo y las células se incubaron entre 4 y 24 horas. Todas las condiciones se han realizado en n=3.

Al final de la incubación se eliminan los sobrenadantes del cultivo y se aclara el tapiz celular con una solución de PBS. Las placas se congelaron inmediatamente en seco a -80°C.

4. Modo de uso del chip Affymetrix® U219: Análisis de la expresión diferencial

- Preparación de los objetivos

Las ARN totales de cada muestra se han extraído con ayuda de *TriPure Isolation Reagent*® siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. La cantidad y calidad de las ARN se evaluaron por electroforesis capilar (Bioanalyzer 2100, Agilent).

La amplificación de las ARN y la síntesis de los análogos de ARN biotiniladas (ARNa) se realizaron con ayuda del kit «GeneChip 3' IVT Express» (Affymetrix®). Las ADN complementarias (ADNc) monocatenarias se han sintetizado por transcripción inversa de las ARN totales con oligo(dT).

Posteriormente se sintetizó una ADNc bicatenaria (ADNdb) por acción de una ADN polimerasa. A continuación se sinterizaron ARN biotiniladas a partir de las ADNc y en presencia de análogos de ribonucleótidos biotinilados. Tras una etapa de purificación en esferas magnéticas que permitió eliminar las sales, las enzimas y los nucleótidos libres, las ARN biotiniladas se hidrolizaron en fragmentos de 35 a 200 nucleótidos con un pico de 100-120 nucleótidos (objetivos fragmentados).

Los controles de calidad de las ARN biotiniladas sintetizadas se realizaron por electroforesis capilar (Bioanalyzer 2100, Agilent), antes y después de la fragmentación.

- Protocolo de hibridación y de marcado

Esta etapa se realizó con ayuda del kit «GeneAtlas™ hybridization, wash and stain kit for 3'IVT arrays» (Affymetrix®).

La hibridación de las ARNa fragmentadas en el chip Affymetrix® U219 (36.000 transcritos y variantes) se realizó en la estación de hibridación «GeneAtlas™ fluidics station» (Affymetrix®) durante 20 horas a 45°C. En el transcurso de la hibridación se añadieron sondas de control de hibridación (BioB, BioC y BioD) y de las ARN pol-A de control (Lys, Phe y Dap). Las sondas de control de la hibridación, directamente acopladas a la ficoeritrina permiten asegurar la eficacia de

la hibridación independientemente de la etapa de marcado. Por su parte, las ARN pol-A de control se utilizan para confirmar la calidad del marcado.

Acto seguido se procedió al marcado en tres etapas (más las
5 etapas de lavado intermedio):

- Fijación del complejo estreptavidina-ficoeritrina en las ARN hibridadas en el chip;
- Reconocimiento de este complejo por un anticuerpo antiestreptavidina acoplado a la biotina;
- 10 - Adición de la estreptavidina unida a la ficoeritrina para amplificar la señal.

5 Tratamiento de los datos

Los datos sin procesar fueron enviados y editados en el programa Microsoft Excel.

- 15 Las comparaciones intergrupales se realizaron con ayuda de la prueba T de Student bilateral no apareado. Los análisis estadísticos pueden interpretarse si $n \geq 5$; en cambio, con $n < 5$, los datos calculados solo se ofrecen a título indicativo.

Fórmulas empleadas:

- 20 Error estándar de la $esm = \text{desviación estándar (dS)} / \sqrt{n}$
media:

El error estándar de la media (esm) es la desviación de la media de la muestra en relación a la media de la población real.

El esm se calcula dividiendo la dS por la

raíz cuadrada del tamaño de la muestra

5

6 Resultados

Se realizó un análisis de los «fold change» (cambios de
10 proporción) en el programa Excel seguido de un análisis
funcional con ayuda del software IPA (*Interactive Pathway
Analysis*) de Ingenuity. Este análisis permite reagrupar los
genes significativamente modulados en funciones (procesos)
biológicas.

15 Análisis de los fibroblastos (NHDF)

El análisis de los perfiles transcriptómicos de los
fibroblastos tratados por las fracciones (I, II y III)
demostró una modulación de expresión de genes, especialmente
con la fracción II.

20 En cuanto a la fracción II, resulta de interés la modulación
de la expresión del gen codificador de la fibrilina 1 (FBN1).
En efecto, la expresión de este gen aumentó de manera
considerable al cabo de 4 horas (X 3,27) y de 24 horas (X
8,24).

La fibrilina 1 (principal componente de la matriz extracelular) es segregada por los fibroblastos y constituye un componente importante de las microfibrillas. Interviene en la unión de las fibras de elastina y cumple un importante
5 papel en la elasticidad de la piel.

Análisis de los queratinocitos (NHEK)

El análisis de los perfiles transcryptómicos de los queratinocitos tratados por las tres fracciones (I, II y III) demostró una modulación de expresión de genes, especialmente
10 con la fracción III.

Los tratamientos de los queratinocitos por las tres fracciones (I, II y III) han inhibido la expresión de los siguientes genes codificadores de proteínas de diferenciación del queratinocito: KRT1, IVL, DSG1, DSC1, SPRR2A, SPRR2E,
15 SPRR1A, SPRR2D, CALML5, SBSN y KRTDAP.

Este efecto permite afirmar que las fracciones I, II y III tienen un efecto antidiferenciante en los queratinocitos.

En los ejemplos siguientes, el ingrediente activo de la invención puede encontrarse en distintas composiciones en una
20 cantidad eficaz comprendida entre el 10^{-6} y 3% de la masa de la composición.

Ejemplo 6: Composiciones para administración por vía oral

El extracto del cáliz de *Physalis peruviana* con ésteres de

sacarosa se incorpora a composiciones orales que permitan administrar entre 50 mg y 200 mg de extracto diario.

1) Composición antiedad en forma de cápsulas blandas

- Extracto de cáliz de <i>Physalis peruviana</i> según el ejemplo <u>1</u> o 2 o 3	30 mg
- Aceite de argán	60 mg
- Aceite de germen de trigo rico en material no saponificable	300 mg
- Vitamina del grupo B (B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)	QSP 100% de los AJR
- Tocotrienoles	QSP 50% de los AJR
- Vitamina E	
- Cera de abejas	
- Lecitina de soja	
- Gelatina alimentaria	
- Glicerina	QSP 1 cápsula blanda

5 -

Esta composición se administra en 4-6 cápsulas diarias.

2) Composición para mejorar la firmeza de la piel en forma de comprimidos

10

- Extracto de cáliz de <i>Physalis peruviana</i> según el ejemplo 1 o 2 o 3	25 mg
---	-------

- Extractos de cereales (trigo, trigo sarraceno, arroz, quinoa) ricos en ácidos aminados azufrados	200 mg
- Zinc en forma de quelato	QSP 100% des AJR
- Vitamina C	QSP 50% de los AJR
- Glicosaminoglicanos obtenidos de cartílago de pescado	200 mg
- Glucidex IT 19 (agente de compresión)	QSP 1 comprimido de 800 mg

Esta composición se administra en 5-8 comprimidos diarios.

5 3) Ejemplo de barra de cereales con sabor chocolate

- Extracto de cáliz de <i>Physalis peruviana</i> según el ejemplo 1, 2 o 3	200 mg
- Licopeno	6 mg
- Astaxantina	4 mg
- Fucoxantina	4 mg
- Luteína en forma microencapsulada	4 mg
- Tocotrienoles micro-encapsulados	QSP 100% AJR en Vitamina E
- Chocolate negro, oligo-fructosa, azúcar, sirope de fructosa, cacao magro en polvo, cereales crujientes, leche descremada en polvo, almendras, glicerol, sorbitol, aceites vegetales, sirope de glucosa, aroma, leche concentrada azucarada, lecitina de soja, mono y diglicéridos de ácidos grasos, sirope caramelizado, maltodextrina, sal, sorbato de potasio, alfa-tocoferol	QSP una barra de 50 g

Esta composición se administra una vez al día.

4) Ejemplo de bebida láctea con sabor a vainilla

Extracto de cáliz de <i>Physalis peruviana</i> según el ejemplo 1, 2 o 3	200 mg
- Extracto de té verde rico en polifenoles	100 mg
- Vitamina del grupo B (B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)	QSP 100% de los AJR
- Zinc, magnesio, selenio	QSP 100% de los AJR
Leche descremada en polvo, aroma, fructosa, clara de huevo, semillas de vainilla agotada, azúcar, caramelo, betacaroteno, goma xantana, aspartamo, acesulfamo de potasio, lecitina de soja, maltodextrina.	QSP un sobre de 30 g

5

Esta composición se administra una vez al día

Ejemplo 7: Composición cosmética: crema de día para el rostro

	Nombres INCI	% en masa
	Fase A	
5	Agua	Qsp 100
	Carbopol	0,25
	Fase B	
	Butilenglicol	2,00
	Fenoxietanol	qs
	Fase C	
10	Steareth-2	0,40
	Steareth-10	1,20
	Alcohol cetearílico, fosfato de diacetilo y Ceteth 10 fosfato	4,00
	Alcohol cetearílico	1,00
	Azono	2,50
15	Cilohexasiloxano y ciclopentasiloxano	2,00
	Etilhexil succinato	7,00
	Fase D	
	Sorbato de potasio	0,10
	Fase E	
	Agua	3,00
20	Hidróxido de sodio	0,40
	Fase F	
	Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	2,00

Instrucciones:

Pesar la fase A y dejar que se infle sin agitar durante 30 minutos. Calentar la fase A al baño maría a 75 °C. Pesar y
 5 mezclar la fase B. Pesar la fase C y calentar al baño maría a 75°C. Añadir la fase B a la fase A. Mezclar bien. Agitando, verter la fase C en la fase A+B. Mezclar bien. Añadir la fase D de manera extemporánea. Añadir la fase E y mezclar bien. Añadir la fase F y mezclar bien.

10

Ejemplo 8: Composición cosmética: gel para el rostro

15

20

Nombres INCI	% en masa
Fase A	
Agua	Qsp 100
Cetil hidroxietilcelulosa	0,30
Fase B	
Carbopol	0,40
Agua	20,00
Fase C	
Glicerina	3,00
Etil y metil y propil parabenos	0,30
Fase D	
Aceite mineral	4,00
Polisorbato 20	1,00

5	C12-15 Alquil-benzoato	2,00
	C10-30 Alquil Acrilatos cross polímero	0,30
	Fase E	
	Sorbato de potasio	0,10
	Fase F	
10	Agua	5,00
	Hidróxido de sodio	0,50
	Fase G	
	Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	1,00

Instrucciones de preparación:

- 15 Dispersar la fase A agitando. Espolvorear el Ultrez 10 en el agua, dejar que se infle 30 minutos. Calentar la fase C hasta que se diluya completamente. Mezclar la fase A con la fase B. Añadir C en la fase (B+A). Añadir la fase D, agitando, en la fase (A+B+C). Añadir la fase E. Neutralizar con la fase F.
- 20 Añadir la fase G y mezclar.

Ejemplo 9: Composición cosmética: forma sérum

	Nombres INCI	% en masa
5	Fase A	
	Agua	Qsp 100
	Carbopol	0,25
	Fase B	
	Butilenglicol	3,00
10	Fenoxietanol	0,20
	Fase C	
	Polisorbato 20	0,50
	Cetearil etilhexanoato	2,00
	PPG-3 Bencil éter miristato	0,50
15	Acrilatos/C 10-30 Alquil polimero	0,20
	Acrilatos cross	
	Ciclopentasiloxano	1,00
	Fase D	
	Sorbato de potasio	0,10
20	Fase E	
	Hidróxido de sodio	0,45
	Agua	4,00
	Fase F	

5

Ingrediente activo según la invención (ejemplo 1 o 2 o 3)	1,00
Fase G	
Fragancia	0,10

Instrucciones de preparación:

Fase A: Espolvorear el carbopol en el agua y dejar que se
 10 infle 15 minutos. Mezclar la fase B y verterla en la fase A.
 Ligar bien. A continuación pesar la fase C, mezclar y añadir
 a la fase A+B agitando. Dejar que se hinche durante una hora.
 Extemporáneamente añadir la fase D a la fase anterior
 agitando. Neutralizar con la fase E. Agitar.
 15 Añadir a continuación la fase F. Dejar mezclar al menos una
 hora agitando y añadir después la fase G. Mezclar bien.

Ejemplo 10: Crema de noche para el rostro

	Nombres INCI	% en masa
5	Fase A	
	Agua	Qsp 100
	Carbopol	0,40
10	Fase B	
	Glicerina	3,00
	Etil y metil y propil parabenos	0,30
15	Fase C	
	Alcohol cetearílico y polisorbato 20	1,0
	Alcohol cetearílico	1,00
20	PPG-3 Bencil éter miristato	1,0
	Dimeticona	2,50
	Isotridecil isononanoato	5,00
	Fase D	
	Sorbato de potasio	0,10
	Fase E	
	Hidróxido de sodio	0,40
	Agua	4,00
	Fase F	
	Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	1,00
	Fase G	
	Fragancia	0,10

Instrucciones de preparación: Pesar la fase A y dejar que se infle durante 30 minutos. Calentar la fase A al baño maría a 75°C; calentar la fase B hasta que se disuelva por completo.

- 5 Añadir la fase B a la fase A. Calentar la fase C al baño maría a 75°C. Añadir la fase C a la fase A+B agitando. Añadir la fase D y mezclar bien. Neutralizar con la fase E a 55°C. Añadir la fase F y después la fase G y mezclar bien.

10

15

20

Ejemplo 11: Crema para el cuerpo.

5

10

15

20

Nombres INCI		% en masa
Fase A		
Agua		Qsp 100
Carbopol		0,4
Fase B		
Glicerina		3,00
Etil y metil y propil parabenos		0,30
Fase C		
Estearato de sorbitano		2,00
Aceite mineral		4,00
PPG-3 Bencil éter adipato		1,00
Estearato de glicerilo y PEG 100 estearato		3,00
Fase D		
Sorbato de potasio		0,10
Fase E		
Hidróxido de sodio		0,40
Agua		4,00
Fase F		
Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)		2,00
Fase G		
Fragancia		0,10

Instrucciones de preparación: Pesar la fase A y dejar que se infle durante 30 minutos. Calentar la fase A al baño maría a 75°C. Calentar la fase B hasta que se disuelva por completo. Añadir la fase B a la fase A. Calentar la fase C al baño maría a 75°C. Añadir la fase C a la fase A+B agitando. Añadir la fase D y mezclar bien. Neutralizar con la fase E a 55°C. Añadir la fase F y después la fase G y mezclar bien.

Ejemplo 12: Loción

10

15

20

Nombres INCI		% en masa
Fase A		
Agua		Qsp 100
Fase B		
Butilenglicol		5,00
Fenoxietanol		0,20
Fase C		
Polisorbato 20		2,00
PPG-3 Bencil éter miristato		0,10
Fase D		
Sorbato de potasio		0,10
Fase E		
Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)		1,00
Fase F		
Fragancia		0,10

Instrucciones de preparación: Pesar la fase A, pesar la fase B y mezclar. Añadir la fase B a la fase A agitando durante 30 minutos. Pesar la fase C, mezclar hasta obtener una mezcla homogénea. Añadir la fase C a la fase A+B agitando. Añadir la fase D a la mezcla anterior. Añadir la fase E a la mezcla anterior agitando. Mezclar bien. Pesar la fase F, mezclar y añadir a la mezcla anterior. Mezclar de manera insistente.

Ejemplo 13: Crema de día

10		Nombres INCI	% en masa
		Fase A	
		Agua	Qsp 100
		Carbopol	0,2
		Fase B	
15		Butilenglicol	2,00
		Fenoxietanol	1,30
		Fase C	
		Estearato de glicerilo y PEG 100 estearato	1,00
20		Trigliceridos caprico-caprilico	4,00
		Fase D	
		Acrilatos/C10-30 Alquil Acrilatos cross polímero	0,20
		PPG-3 Bencil éter miristato	1,00
		Dimeticona	1,00

5

10

Fase E	
Sorbato	0,10
Fase F	
Hidróxido de sodio	0,40
Agua	4,00
Fase G	
Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	2,00
Fase H	
Fragancia	0,10

Instrucciones de preparación: Fase A: Verter Ultrez 10 en el agua y dejar que se infle 30 minutos. Pesar la fase B y dejar fundir a 60 °C. Calentar la fase A al baño maría en agua a 75°C. Pesar la fase C y calentar a 75°C en un baño de agua. Agitando (Starvo v=500 t/min), añadir la fase C a la fase A. Añadir arbitrariamente la fase B y la fase D a la fase A+B y añadir a continuación la fase E. Mezclar bien. Enfriar a 45°C y añadir la fase F. A 35°C, añadir la fase G y mezclar bien. Añadir la fase H y mezclar bien.

Ejemplo 14: Líquido para el cuerpo.

	Nombres INCI	% en masa
5	Fase A	
	Agua	5,00
	Carbopol	0,30
	Fase B	
	Agua	Qsp 100
10	Hidroxietilcelulosa	0,40
	Fase C	
	Butilenglicol	3,00
	Fenoxietanol	1,30
	Fase D	
15	C12-C15 Alquil-benzoato	2,00
	Triglicerido caprico-caprilico	3,00
	Polisorbato 20	1,00
	PPG-3 Bencil éter miristato	1,00
	Acrilatos/C10-30 Alquil Acrilatos cross polímero	0,20
20	Fase E	
	Sorbato	0,10
	Fase F	
	Hidróxido de sodio	0,50
	Agua	5,00
	Fase G	
	Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	2,00
	Fase H	
	Fragancia	0,10

Instrucciones de preparación: Fase A: Verter Ultrez 10 en el agua y dejar que se infle 30 minutos. Removiendo con un agitador de hélice (300 rpm), añadir la fase B y dejar que se infle durante una hora. Añadir la fase A a la fase B
 5 removiendo con un agitador de hélice (300 rpm) y mezclar bien. Pesar y agitar la fase C, pesar la fase D y mezclar. Añadir la fase C a la fase A+B. Añadir la fase D a la fase A+B+C. Mezclar bien. Añadir la fase E y después la fase F y G y por último la fase H. pH = 6,2.

10

Ejemplo 15: Crema de noche

15

20

Nombres INCI	% en masa
Fase A	
Agua	5,00
Carbopol	0,30
Fase B	
Agua	Qsp 100
Hidroxietilcelulosa	0,40
Fase C	
Butilenglicol	3,00
Fenoxietanol	1,30
Fase D	
PPG-3 Bencil éter miristato	1,00
Acrilatos/C10-30 Alquil Acrilatos cross polímero	0,20

5

10

Fase E	
Sorbato	0,10
Fase F	
Hidróxido de sodio	0,50
Agua	5,00
Fase G	
Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	2,00
Fase H	
Fragancia	0,10

Instrucciones de preparación: Fase A: Verter Ultrez 10 en el
 15 agua y dejar que se infle 30 minutos. Removiendo con un
 agitador de hélice (300 rpm), añadir la fase B y dejar que se
 infle durante una hora. Añadir la fase A a la fase B
 removiendo con un agitador de hélice (300 rpm) y mezclar
 bien. Pesar y agitar la fase C, pesar la fase D y mezclar.
 20 Añadir la fase C a la fase A+B removiendo con un agitador de
 cuchilla (300 rpm). Añadir la fase D a la fase A+B+C. Mezclar
 bien. Añadir la fase E, después la fase F y G y por último la
 fase H. Mezclar bien.

Ejemplo 16: Crema antiestrías

	Nombres INCI	% en masa
	Fase A	
5	Agua	Qsp 100
	Carbopol	0,40
	Fase B	
	Glicerina	5,00
	Fenoxietanol (y) parabenos mezclados	0,80
	Fase C	
10	Palmitato de etilhexilo	4,00
	Alcohol cetearílico Croda	0,50
	Miristil lactato	0,30
	Polisorbato 20	1,00
	Fase D	
	Acrilatos/C10-30 Alquil Acrilatos cross polímero	0,20
15	Ciclometicona	2,00
	Fase E	
	Sorbato de potasio	0,10
	Fase F	
	Hidróxido de sodio	0,60
	Agua	6,00
	Fase G	
20	Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	1,00
	Fase H	
	Fragancia	0,10

Instrucciones de preparación:

Fase A: Espolvorear Ultrez 10 en el agua y dejar que se infle 20 minutos. Mezclar la fase B y calentar a 60°C hasta que se diluya del todo. Añadir la fase B a la fase A agitando.

- 5 Calentar la fase A+B. Pesar la fase C y calentar a 75°C. Añadir la fase C a la fase A+B agitando. Mezclar con cuidado y añadir la fase D. Añadir la fase E. Neutralizar con la fase F a 50 °C. Añadir la fase G y H a 35°C y ajustar el pH a 6,3 con NaOH.

10

Ejemplo 17: Loción para el cabello

15

20

Nombres INCI	% en masa
Fase A	
Cloruro de cetrimonio	1,00
Ácido cítrico	0,22
Citrato trisódico	1,20
Sorbato	0,10
Agua	Qsp 100
Fase B	
Metilparabeno	0,20
PPG 5 Ceteth 20	2,00
Fase C	
Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	1,00
Fase D	
Polisorbato 20	1,00
Fragancia	0,10

Ejemplo 18: Maquillaje hidratante

	Nombres INCI	% en masa
	Fase A	
5	Agua	Qsp 100
	Hidróxido de potasiohydroxydehy	1,3
	Polisorbato 80	0,1
	Fase B	
	Dióxido de titanio	6,00
	Talco	3,05
10	Óxido de hierro amarillo	1,8
	Óxido de hierro rojo	1,00
	Óxido de hierro negro	0,15
	Fase C	
	Glicol de propileno	4,00
	Silicato de magnesio y aluminio	1,00
15	Fase D	
	Glicol de propileno	2,00
	Carboximetilcelulosa sódica	0,12
	Fase E	
	Di-PPG-3 Miristil éter adipato	12,00
	Isostearil neopentanoato	4,00
20	Alcohol cetearílico, Ceteth-20 fosfato, fosfato de diacetilo	3,00
	Steareth-10	2,00
	Alcohol cetílico	0,62
	Steareth-2	0,5
	Fase F	
	Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	3,00

Ejemplo 19: Bálsamo labial.

	Nombres INCI	% en masa
	Fase A	
5	Agua	Qsp 100
	Sorbato de potasio	0,10
	Sulfato de magnesio	0,70
	Fase B	
	Cetil dimeticona copoliol	3,00
10	Metilparabeno	1,00
	Tribehenino	0,30
	PPG-3 Bencil éter miristato	2,00
	Aceite de semilla de Argania spinoa	19,00
	Fase C	
15	Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)	0,50
	Fase D	
	Fragancia	0,10

20 Instrucciones de preparación: Calentar la fase A a 85°C. Mezclar la fase B y calentar a 85°C. Añadir con suavidad la fase A a la fase B agitando (Staro v=3000 rpm y después 1200 rpm). Añadir la fase C precalentada a 80°C. Mezclar bien. Añadir la fase D a 35°C. Verter.

Ejemplo 20: Spray protector de cabello

5

10

15

20

Nombres INCI		% en masa
Fase A		
Agua		Qsp 100
Etanol		10,00
Polisorbato 20		0,40
Cloruro de cetrimonio		1,00
Fase B		
Butilenglicol (y) extracto de semilla de <i>Helianthus Annus</i>		5,00
Conservador		Qs
Fase C		
Ingrediente activo según la invención (según el ejemplo 1, 2 o 3)		3,00
Fase D		
Agua		0,50
Hidróxido de sodio		0,05

Instrucciones de preparación: Pesar y mezclar la fase A con un agitador de cuchillas a una velocidad de 300 rpm. Añadir la fase B, mezclar y añadir después la fase C. Ajustar el pH entre 5,0 y 5,5 con la fase D.

Ejemplo 21: Ensayos que demuestran el efecto antiedad y rejuvenecedor del extracto de uchuva

En las figuras que ilustran los ejemplos 21 a 23, el extracto
5 de uchuva se ha abreviado como EUc. En todos estos ejemplos
(21 a 23), el extracto de uchuva se ha obtenido con la
técnica de extracción descrita en el ejemplo 3 que presenta
un 99,9% de pureza cromatográfica en ésteres de sacarosa.

Además de proporcionar a la epidermis un soporte sólido,
10 también le aporta nutrientes. La dermis está formada por
fibroblastos y por una matriz extracelular compuesta
mayoritariamente de colágenos, elastina y de una sustancia
denominada *sustancia fundamental*. Estos componentes son
sintetizados por los fibroblastos. La unión dermoepidérmica
15 es la responsable de la cohesión entre la epidermis y la
dermis.

Los colágenos son las proteínas mayoritarias de las matrices
extracelulares de la piel. Hasta la fecha se han
identificados 20 tipos de colágenos y numerados el I al XX.
20 Los colágenos mayoritariamente presentes en el bloque de la
dermis son colágenos de tipo I y III que forman la matriz
extracelular del bloque de la dermis (son colágenos que
constituyen entre el 70-80 % del peso seco de la dermis). Con
la edad, la dermis se vuelve más fina y aparecen arrugas en

la superficie de la piel. Por ello y teniendo en cuenta la importante función del colágeno para la integridad de la piel y su resistencia a las agresiones mecánicas, la estimulación de la síntesis de estos colágenos (en especial de los tipos I y III) se revela como un medio eficaz para paliar los signos del envejecimiento cutáneo (revisión de Tzaphlidou M., Micron 35 (2004) 173-177).

- Objetivos colágeno I y III

El colágeno I es el mayoritario y aporta a la piel su resistencia mecánica.

Esta proteína representa el 90 % del colágeno de un vertebrado y constituye la trama del hueso (podría compararse a una estructura de hormigón armado) y en general de los tejidos conjuntivos banales. Se encuentra en los huesos, la piel, los tendones, la córnea y los órganos internos.

1 - Estudio comparativo de células jóvenes y células envejecidas

El siguiente estudio ha permitido evaluar el efecto del extracto de uchuva en la expresión del colágeno I, el constituyente esencial de la matriz extracelular de la dermis.

- Método

Se sembraron NHDF (fibroblastos dérmicos humanos normales) jóvenes o envejecidos por senescencia replicativa en una placa de 96 pocillos y se incubaron 24 horas a 37°C y a 5% de CO₂.

- 5 Las células se trataron 24 horas con productos de ensayo. Acto seguido las células se fijaron con formalina y se determinó la expresión de proteínas por inmunofluorescencia. Las marcas fluorescentes se digitalizaron y se cuantificaron por microscopía automatizada (Arrayscan Cellomics™). La
- 10 fluorescencia se cuantificó con la bioaplicación *Compartmental Analysis*.

- Evaluación previa de la citotoxicidad

- El compuesto se puso en contacto con las células durante 24 horas. Durante las tres últimas horas del ensayo
- 15 colorimétrico listo para el empleo, se introdujo en el medio WST1 de Roche®,
- un reactivo que contiene sales de tetrazolio, un indicador violeta. Las células metabólicamente activas descomponen este reactivo en formazano, un indicador amarillo. La coloración
- 20 amarilla es por tanto proporcional al número de células vivas. La absorbancia es de 450 nm.

En la prueba se considera que un valor inferior a 90% del control indica una posible citotoxicidad del producto (simbolizada en los gráficos por una línea verde). También

puede indicar que se disminuye la actividad metabólica de las células. Un valor inferior a 75% indica una citotoxicidad elevada (simbolizada en los gráficos por una línea roja).

Por otro lado se observaron las células al microscopio para
5 conocer y comparar su fisionomía.

Los resultados se muestran en la figura 1A.

El extracto de uchuva es citotóxico a las concentraciones más altas del ensayo (de 100 a 20 ppm) y pierde citotoxicidad a partir de 2 ppm.

10 Concentraciones seleccionadas para someterlas a ensayo:

Se testó el extracto de uchuva con las siguientes concentraciones: 2 - 1 - 0,5 ppm.

Los resultados se muestran en la figura 1B.

El extracto de uchuva permite restablecer la expresión de
15 colágeno I al nivel de las células jóvenes. En estas células, la expresión del colágeno I no es homogénea (algunas presentan un marcado fuerte y otras, más débil). En el caso de las células envejecidas por replicación y tratadas con extracto de uchuva, la expresión se ha reactivado de una
20 manera más homogénea.

El hecho de que la concentración más baja sea activa puede explicarse por la ligera citotoxicidad de las concentraciones más fuertes, lo que afecta a la síntesis de proteínas.

- Conclusión

El extracto de uchuva es un ingrediente que actúa sobre el colágeno I, objetivo del envejecimiento cutáneo, restableciendo la expresión proteica hasta los niveles observados en células jóvenes.

5

2 - Evaluación del efecto del extracto de uchuva en la producción de colágeno I por los fibroblastos

Materiales y métodos empleados

- Sistema de ensayo

10 Denominación: Modelo de fibroblastos humanos (NHDF) en cultivo utilizados entre los pasos 3 a 6.

Medio de cultivo: DMEM glucosa 4,5 g/L + 1% NEAA + 10% SVF

Condiciones de cultivo: 37°C, 5% de CO₂

Método de cultivo y tratamiento de los fibroblastos

15 - Evaluación de la citotoxicidad por la prueba del rojo neutro

El D0 se sembraron células NHDF en una placa de 96 pocillos a razón de 4×10^3 células por pocillo. El D1 son tratadas en medio de cultivo completo durante 48 horas.

20 Las concentraciones del activo a probar se experimentan en un % del extracto. La solución madre del producto testado se ha preparado en un dimetilsulfoxido (DMSO) con una concentración de 20% (p/v). La primera dilución se realizó a 1/1000. Las diluciones siguientes se realizaron al $\frac{1}{2}$ manteniendo la

concentración de DMSO final a 0,1%.

La prueba de RN se realizó en el D3, de la siguiente manera:
se elimina el medio y las células se aclaran con 250 µL de
PBS precalentado a 37 °C. Se añaden 200 µl de rojo neutro a
5 las células. Tras tres horas de incubación a 37°C y 5% de
CO₂, se elimina el medio que contiene el rojo neutro y
después las células se aclaran con 2 x 200 µl de PBS
precalentado a 37°C. Se añaden 100 µl de solución de revelado
(etanol 50% - ácido acético 1%) y las células se incuban a
10 temperatura ambiente agitando y al abrigo de la luz durante
45 minutos.

La DO540nm se mezcla bien y se mide.

Nota: Cómo preparar la solución de rojo neutro: la solución
madre de rojo neutro se prepara con 0,4% de agua Ultra Pura
15 (esta solución se conserva a 4°C durante 15 días), se diluye
extemporáneamente al 1/80 en el medio de cultivo completo y
después se centrifuga 10 minutos a 3000 revoluciones por
minuto (rpm) antes del uso.

-Evaluación de la actividad metabólica mediante la
20 prueba MTT (metil-tiazol-tetrazolio)

El D0 se sembraron células NHDF en una placa de 96
pocillos a razón de 4×10^3 células por pocillo. El D1 son
tratadas en medio de cultivo completo durante 48 horas.

Las concentraciones del activo a probar se experimentan

en un % del extracto. La solución madre del producto objeto de la prueba se ha preparado en un dimetilsulfoxido (DMSO) con una concentración de 20% (p/v). La primera dilución se realizó a 1/1000. Las diluciones siguientes se realizaron al
 5 $\frac{1}{2}$ manteniendo la concentración de DMSO final a 0,1%.

En el D3 se realiza la prueba MTT de la siguiente manera: el medio se sustituye por 100 μ L de MTT a 0,5 g/L en un medio completo. Tras tres horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, la solución de MTT se reemplaza por 100 μ L de DMSO. La
 10 DO540nm se mezcla bien y se mide (la dosificación es la misma que la indicada para la prueba anterior del rojo neutro).

- Producto testado y modo de preparación

Denominación del producto testado: extracto de uchuva

Tras las dos primeras pruebas antes citadas, se seleccionaron
 15 tres concentraciones del producto testado para someterlos a nuevas pruebas: $8 \cdot 10^{-5}\%$ (0,8 ppm), $16 \cdot 10^{-5}\%$ (1,6 ppm) y $32 \cdot 10^{-5}\%$ (3,2 ppm)

- Dosificación del colágeno I en los sobrenadantes del cultivo por el método ELISA

20 El D0 se siembran las células en placas de 6 pocillos a razón de 25×10^3 células por pocillo. El D1 son tratadas en medio de cultivo completo durante 48 horas.

Las concentraciones del activo a probar se experimentan en un % del extracto. La solución madre del producto objeto de la

prueba se ha preparado en un dimetilsulfoxido (DMSO) con una concentración de 20% (p/v). La primera dilución se realizó a 1/1000. Las diluciones siguientes se realizaron manteniendo la concentración de DMSO final a 0,016% (lo que equivale a la mayor concentración de DMSO del extracto).

Al cabo de 48 horas, los sobrenadantes del cultivo se recuperan y se almacenan a -80°C .

La dosificación del colágeno I se realiza según las instrucciones del proveedor del ELISA (Tecomedical).

10 Efecto del extracto de uchuva sobre la producción de colágeno I por fibroblastos en cultivo 48 h:

Tabla con las cantidades de colágeno I (μg) para 10^4 células:

15	Condiciones	N.º de células por condición ($\times 10^4$)	Cantidad de Col I en $\text{ng}/10^4$ célula DO1	Cantidad de Col I en $\text{ng}/10^4$ célula DO2	Cantidad de Col I en $\text{ng}/10^4$ célula DO3	Cantidad de Col I en $\text{ng}/10^4$ célula DO4	Media	Desviación típica
	2,5 x 10 ⁴ células/pocillo dilución al 1/5							
20	Control	14	49,4	48,1	49,7	49,0	49,0	0,71
	Control DMO	16	47,5	48,9	46,0	50,5	48,2	1,93
	Extracto de uchuva (EUc) $8 \times 10^{-5}\%$	12	57,6	69,8	64,8	59,5	63,0	5,5,
		12	63,8	63,8	65,5	63,0	64,0	1,06
	Extracto de uchuva (EUc) $16 \times 10^{-5}\%$	13	52,7	56,1	47,3	50,2	51,6	3,74
	Extracto de uchuva (EUc) $32 \times 10^{-5}\%$							

Estos resultados permiten constatar un aumento significativo de

la producción de colágeno I de 29% y 30% por los fibroblastos tratados durante 48 horas por el extracto de uchuva con concentraciones más débiles (respectivamente $8 \cdot 10^{-5}\%$ y $16 \cdot 10^{-5}\%$) respecto al control.

- 5 Con la concentración más fuerte ($32 \cdot 10^{-5}\%$), la producción de colágeno I por los fibroblastos disminuye a un nivel cercano a las condiciones controladas. Esta disminución puede explicarse por un inicio de toxicidad celular a esta mayor concentración.
- 10 Los resultados se presentan en la figura 2A.

3 - Evaluación del efecto del extracto de uchuva en la producción de colágeno III por los fibroblastos

- El D0 se siembran las células en placas de 6 pocillos a razón de 25×10^3 células por pocillo. El D1 son tratadas en medio de cultivo completo durante 48 horas.

- Las concentraciones del activo a probar se experimentan en un % del extracto. La solución madre del producto objeto de la prueba se ha preparado en un dimetilsulfoxido (DMSO) con una
- 20 concentración de 20% (p/v). La primera dilución se realizó a 1/1000. Las diluciones siguientes se realizaron manteniendo la concentración de DMSO final a 0,016% (lo que equivale a la mayor concentración de DMSO del extracto):

EUc
8 x 10⁻⁵ %

EUc
16 x 10⁻⁵ %

EUc
32 x 10⁻⁵ %

Al cabo de 48 horas, los sobrenadantes del cultivo se recuperan y se almacenan a -80°C .

La dosificación del colágeno I se realiza según las instrucciones del proveedor del ELISA (SunRed).

Efecto del extracto de uchuva sobre la producción de colágeno III por fibroblastos en cultivo 48 h:

Tabla con las cantidades de colágeno III (μg) para 10^4 células:

15

20

Cantidad de colágeno III en $\mu\text{g}/10^4$ de células	MEDIA	Y
Control	0,78	0,21
Control DMO	0,82	0,17
Extracto de uchuva (EUC) $8 \times 10^{-5}\%$	0,9	0,34
Extracto de uchuva (EUC) $16 \times 10^{-5}\%$	1,17	0,11
Extracto de uchuva (EUC) $32 \times 10^{-5}\%$	0,86	0,06

El análisis de estos resultados demuestra un aumento de la concentración dependiente de la producción de colágeno III

inducida por el extracto de uchuva. La producción es máxima a una concentración de $16 \cdot 10^{-5}\%$ (+50% respecto a los controles).

Con la concentración del extracto más fuerte ($32 \cdot 10^{-5}\%$), la
 5 producción de colágeno III por los fibroblastos disminuye a un nivel cercano a de la condición controlada como en el caso de la producción de colágeno I. Esta observación confirma la presencia de toxicidad celular a este grado de concentración. Los resultados se presentan en la figura 2B.

10

4 - Evaluación del efecto del extracto de uchuva en el objetivo colágeno IV

El colágeno es el constituyente mayoritario de la MEC (aproximadamente el 70%) y es sintetizado por los
 15 fibroblastos. Los hay de dos tipos: colágenos fibrilares (I, II, III, V, XI) y no fibrilares (IX, XII, XIV, XVI). Las fibras de colágeno son flexibles, lo que las hace resistentes a las fuerzas de tensión en los tejidos. Forman haces ondulados de longitud y grosor variable. El colágeno de tipo
 20 IV es especial pues forma la «red primaria» des membranas basales (lámina densa). También participa en la adhesión celular, la proliferación, la migración y la angiogénesis (melanoma). Cuenta con un punto de interacción con el receptor en las integrinas. Se sitúa en el punto de contacto

entre la lámina basal y la matriz extracelular o MEC (S Pasco et al., *Cancer Detection and Prevention*, 29,260, 2005). El colágeno IV forma, junto con las lamininas 1, una red que constituye el armazón de la membrana basal y es el soporte estructural y funcional de los tejidos.

Se han testado las dos concentraciones del extracto de uchuva (4,10-5% y 8,10-5%).

Evaluación de la cantidad de proteínas de la matriz extracelular producidas por los fibroblastos en 48 horas

10 - Detección de la expresión del colágeno IV por inmunocitología

En el D0 las células se sembraron en portaobjetos Millicell de 8 pocillos a razón de $4 \cdot 10^3$ células por ml en 400 μ l de medio completo. El D1 son tratadas en medio de cultivo completo durante 48 horas. Las concentraciones del activo a probar se experimentan en un % del extracto. La solución madre del producto objeto de la prueba se ha preparado en un dimetilsulfoxido (DMSO) con una concentración de 20% (p/v). La primera dilución se realizó a 1/1000. Las diluciones siguientes se realizaron manteniendo la concentración de DMSO final a 0,1%. Al cabo de 48 horas, las células se fijan por una mezcla alcohol-ácido. A continuación las células se marcaron con ayuda de un anticuerpo anticolágeno IV (Rockland) diluido en PBS + BSA/tween al 1/50 durante 1 hora.

A continuación los portaobjetos se enjuagan dos veces con PBS. La revelación del marcado específico se realiza con ayuda de un anticuerpo secundario conjugado con FITC (Santa-Cruz) diluido en PBS + BSA/tween al 1/100 durante una hora.

5 Posteriormente los portaobjetos se enjuagan dos veces con PBS y se montan entre portaobjetos y cubreobjetos con ayuda del líquido de montaje RotiMount Fluocare + DAPI (Roth).

Se tomaron fotos en el verde y el azul con una cámara DP72 (Olympus, Japón) acoplada a un microscopio de
10 epifluorescencia BX-60 (Olympus, Japón).

Las fotos se observaron con dos lectores y se realizó una evaluación de intensidad de fluorescencia en una escala lineal de 0 (sin marcado) a 4 (marcado muy fuerte).

Paralelamente se añadió una concentración de ramnosa en este
15 ensayo como control positivo para la expresión del colágeno IV. En efecto, se sabe que la ramnosa y los polisacáridos que contienen inducen la síntesis de colágenos en los fibroblastos²². Los resultados se presentan en la figura 3A.

El análisis de los resultados revela un fuerte aumento de la
20 expresión de colágeno IV (aproximadamente de +300%) en los fibroblastos tratados durante 48 horas por el extracto de UCHUVA, con independencia de la concentración utilizada. La amplitud de este aumento de la expresión del colágeno IV es comparable a la obtenida con la ramnosa.

5 - Evaluación del efecto del extracto de uchuva en el objetivo elastina

La elastina es una glicoproteína estructural (como la laminina y la fibronectina) que entra en la composición de la matriz extracelular. La elastina pertenece a la familia de las proteínas fibrosas de tipo estructural. La secretan los fibroblastos sobre todo durante el periodo de crecimiento y posee propiedades elásticas. La síntesis de elastina disminuye con la edad, siendo reemplazada por colágeno inextensible. Las estrías son un ejemplo visible de este proceso, asociado a tensiones mecánicas. Otro ejemplo sería el envejecimiento cutáneo.

En la matriz extracelular:

La elastina la sintetizan y la secretan los fibroblastos en el espacio extracelular (primero proelastina y después tropoelastina). La elastina es el principal componente (hasta un 90 %) de las fibras elásticas a las que se añade la fibrilina.[Por tanto, el colágeno unido a la elastina y a la fibrilina (las cuales forman las fibras elástica por enlaces transversales covalentes) son los principales constituyentes de la matriz extracelular[]. La producción total de elastina cesa en torno a la pubertad. A partir de ese momento la cantidad de elastina disponible comienza a

disminuir.

Deterioro:

El deterioro de la elastina se asocia a la acción de la elastasa, una enzima secretada por los fibroblastos. La α 1-
5 antitripsina inhibe la acción enzimática de la elastasa. Al inhibirse el deterioro se crea un equilibrio que aumenta la estabilidad de la elastina.

Función:

Rasgos distintivos de la elastina: la elastina permite la
10 unión de las células y la formación de los tejidos biológicos. Así, el correcto funcionamiento de la piel, los pulmones, los vasos sanguíneos, el tejido conjuntivo, algunos tendones y cartílagos está íntimamente relacionado con el estado de la elastina. Como su nombre indica, la elastina es
15 elástica, siendo cinco veces más elástica que una goma elástica del mismo diámetro. Al poder estirarse hasta el 150% de su longitud en reposo sin romperse[], permite a los tejidos estirarse y recuperar su estado original tras el estiramiento, lo que les aporta flexibilidad.

20 La dermis:

La elastina se encuentra en la dermis de la piel, que actúa como sostén. Con el envejecimiento, por ejemplo, la pérdida de elasticidad y de tonicidad de la dermis no puede contrarrestar los efectos de contracción de los músculos

subyacentes, dando lugar a la aparición de arrugas. Por otro lado, la exposición a los rayos ultravioletas agrava el deterioro de la elastina[].

5 Estudio sobre células jóvenes y células envejecidas

El estudio siguiente ha permitido evaluar el efecto del extracto de uchuva sobre la expresión de la proteína elastina.

Metodología

10 Se sembraron NHDF (fibroblastos dérmicos humanos normales) jóvenes o envejecidos por senescencia replicativa en una placa de 96 pocillos y se incubaron 24 horas a 37°C y al 5% de CO₂.

Las células se trataron 24 horas con productos de ensayo.

15 Acto seguido las células se fijaron con formalina y se determinó la expresión de proteínas por inmunofluorescencia.

Las marcas fluorescentes se digitalizaron y se cuantificaron por microscopía automatizada (Arrayscan CellomicsTM). La fluorescencia se cuantificó con la bioaplicación

20 Compartmental Analysis.

Modelos celulares:

- Jóvenes: NHDF de donante joven (25 años)
- Envejecimiento por senescencia replicativa: NHDF de

donante joven cultivados en varias fases hasta alcanzar la senescencia.

Los resultados se presentan en la figura 3B.

- 5 El extracto de uchuva permite restablecer la expresión de elastina ligeramente por encima del nivel proteico de las células jóvenes.

Conclusión

- Los resultados obtenidos demuestran que el extracto de uchuva
10 mejora la elasticidad in vitro que podría extrapolarse in vivo.

6 - Evaluación del efecto del extracto de uchuva en el objetivo metilación del ADN

- 15 La metilación es una modificación del extremo N-terminal de las histonas. Puede tener lugar en lisinas o en argininas y concretizarse añadiendo uno, dos o tres grupos metilos. En función de los residuos metilados y del número de grupos añadidos, se asociará a una activación o represión de la
20 transcripción. La metilación de las histonas, que durante mucho tiempo se consideró estática, es una modificación reversible implicada en un proceso dinámico, aunque mucho más estable que la acetilación y la fosforilación. Cada vez aumenta más el número de histonas desmetilasas

identificadas[]]. Como, en general, este tipo de modificación es antagonista a la acetilación, las lisinas deben desacetilarse antes de preceder a su metilación. Este antagonismo entraña la formación de cierto equilibrio dinámico entre las regiones de heterocromatina (por lo general no expresables y metiladas en determinados ácidos aminados clave) y las eucromatinas (normalmente expresables y acetiladas). Se sabe, por ejemplo, que la lisina 9 de la histona H3 está asociada a una represión de la cromatina medioambiental cuando está metilada. Esta metilación es reconocida por una proteína (la HP1) que se fija en una H3 metilada. Por su parte, la HP1 atrae a la proteína Suv39, una histona metiltransferasa capaz de metilar la lisina 9 de la histona H3 del nucleosoma vecino, y así sucesivamente. Vemos pues que, de vecino en vecino, las histonas H3 se metilan y la cromatina se condensa. Pero esta invasión heterocromatiniana se detendrá si la lisina 9 de la H3 ya está acetilada. De esta forma se crea un equilibrio competitivo entre dominios cromatinianos expresados y reprimidos. Las alteraciones de las colas de histonas cumplen un papel de «marcas» epigenéticas que entrañan el reclutamiento de distintas clases de proteínas, pues las lisinas acetiladas o metiladas son reconocidas por distintos dominios proteicos. Además, el reclutamiento de algunos

factores a nivel de la cromatina requiere de la existencia previa de alteraciones de histonas y de proteínas ya vinculadas. El código de las histonas se interpreta así en el contexto de otros factores asociados a la cromatina, siendo la combinación de interacción entre las histonas modificadas y otros factores lo que determina si una proteína es reclutada en la cromatina. El envejecimiento afecta a todos los tejidos del organismo. Este proceso está asociado a alteraciones epigenéticas como los cambios de metilación a nivel de residuos de citoxina específicos del ADN, tal y como se ha descrito en numerosas publicaciones²⁴⁻³¹. El efecto de las modificaciones epigenéticas en el envejecimiento, y la acumulación de divisiones celulares y de macromoléculas deterioradas contribuyen al envejecimiento del fenotipo. También los factores medioambientales y aleatorios pueden alterar este fenotipo mediante mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN y la metilación y la acetilación de las histonas. Al ser potencialmente reversibles, las alteraciones epigenéticas son objetivos atractivos para tratar patologías asociadas al envejecimiento.

Estudio sobre células jóvenes y células envejecidas

Para comprender el mecanismo de reactivación de la expresión proteínica observada, hemos analizado la metilación del ADN

en células envejecidas intrínsecamente. En efecto, uno de los signos del envejecimiento celular es la acumulación de zonas metiladas dentro del ADN, a nivel de las citosinas contenidas en los dinucleótidos CpG, que entraña la desactivación de los promotores y la disminución de la expresión de algunos genes.

- Método

Se sembraron NHDF (fibroblastos dérmicos humanos normales) jóvenes o envejecidos intrínsecamente por replicación en una placa de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y a 5% de CO₂, hasta alcanzar la subconfluencia. Las células se trataron 24 horas con productos de ensayo. Posteriormente las células fueron separadas con tripsina y lisadas. El ADN genómico se precipitó con etanol. La tasa de metilación del ADN se dosificó por el método ELISA utilizando el kit Enzo: 5-metilcitosina DNA ELISA kit. Para una mejor visibilidad de los resultados, se representan los valores a partir del 50%.

Modelos celulares:

- Jóvenes: NHDF de donante joven (25 años)
- Envejecimiento por senescencia replicativa: NHDF de donante joven cultivados en varias fases hasta alcanzar la senescencia.

Tras evaluar previamente su citotoxicidad, el extracto de uchuva se testó en las concentraciones siguientes: 2 - 1 - 0,5 ppm.

- Resultados: Los resultados se presentan en la figura 4A.

Conclusión

Según los resultados, el extracto de uchuva reduce la tasa de metilación en las tres concentraciones testadas respecto al
5 modelo de piel envejecida.

7 - Evaluación del efecto del extracto de uchuva en el objetivo fibrilina-1

La fibrilina 1 es la proteína constituyente de las
10 microfibrillas, las cuales se asocian a las fibras elásticas y participan en su unión.

Estudio sobre células jóvenes y células envejecidas

Metodología

Se sembraron NHDF (fibroblastos dérmicos humanos normales)
15 jóvenes en una placa de 96 pocillos y se incubaron 24 horas a 37°C y a 5% de CO₂. Las células que debían someterse a envejecimiento extrínseco se irradiaron tres veces con rayos UVA (con 24 horas de intervalo entre cada irradiación) y una vez con rayos UVB. Entre radiación y radiación, las células
20 se trataron con productos de ensayo. Acto seguido las células se fijaron con formalina y se determinó la expresión de proteínas por inmunofluorescencia. Las marcas fluorescentes se digitalizaron y se cuantificaron por microscopía automatizada (Arrayscan CellomicsTM). La fluorescencia se

cuantificó con la bioaplicación *Compartmental Analysis*.

Modelos celulares:

- Jóvenes: NHDF de donante joven (25 años)
 - Envejecimiento inducido con rayos UVA/B: NHDF de donante
- 5 joven irradiados con rayos UVA y UVB

Productos testados

Tras evaluar previamente su toxicidad, el extracto de uchuva se testó en las concentraciones siguientes: 2 - 1 - 0,5 ppm.

Resultados

- 10 Los resultados se presentan en la figura 4B.

El extracto de uchuva a 0,5 ppm permite restaurar la expresión de la fibrilina 1 a un nivel equivalente e incluso ligeramente superior al de las células jóvenes.

- Conclusión general sobre el efecto antiedad y rejuvenecedor

- 15 El envejecimiento altera las fibras de colágeno y las fibras elásticas pues reduce su síntesis y acelera su deterioro. Para demostrar que el extracto de uchuva favorece el rejuvenecimiento celular, se cuantificó la expresión de las proteínas que conforman la estructura de estas fibras en
- 20 células envejecidas de manera intrínseca (senescencia replicativa) en el caso del colágeno I y de la elastina, o extrínseca por irradiación repetida de UV (fotoenvejecimiento) en el caso de la fibrilina 1.

El extracto de uchuva permite restablecer la expresión de los

tres marcadores.

En los estudios realizados, el extracto de uchuva ha restablecido totalmente la expresión de las proteínas a niveles comparables con los grupos de control jóvenes. Ahí
5 radica todo el interés de los efectos observados: el extracto de uchuva respeta el equilibrio biológico de la piel y no existe sobreexpresión aberrante.

Asimismo, las células tratadas con extracto de uchuva presentaron un aumento considerable de la expresión del
10 colágeno IV fibroblástico en comparación con las células no tratadas, de una manera similar a la ramnosa, reconocida por esta virtud. El tratamiento de los fibroblastos con extracto de uchuva también aumenta la cantidad de colágeno III. Todos estos resultados confirman su eficacia antiedad a nivel
15 estructurante y redensificante.

En cuanto al análisis de la metilación del ADN, el extracto de uchuva ha revelado resultados homogéneos en este estudio al disminuir la metilación en las tres concentraciones testadas. Este efecto ha permitido conocer el mecanismo de
20 acción de este producto: su capacidad para reactivar la expresión de proteínas de la matriz extracelular es lo que le confiere un efecto rejuvenecedor.

Se confirma así que el extracto de uchuva es un ingrediente o principio activo con actividad biológica antiedad,

antienvejecimiento y rejuvenecedora. Actúa de manera coherente en tres objetivos del envejecimiento cutáneo al restablecer la expresión proteica hasta el nivel observado en las células jóvenes. También presenta una actividad innovadora en el epigenético como lo demuestra su acción sobre la metilación del ADN en las células maduras. Y por último, con su eficacia en la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, demuestra ejercer una acción antiedad en profundidad.

10

Ejemplo 22: Ensayos que demuestran el poder hidratante y estructurante del extracto de uchuva sobre la epidermis

En la capa granulosa la filagrina se sintetiza en forma de un precursor, la profilagrina (repetición de 10-12 monómeros de filagrina y de la proteína de regulación S-100 NH2 terminal). La detección de esta proteína se asocia a un estado de diferenciación terminal de la epidermis pues aparece tras la desfosforilación y la proteólisis de la profilagrina, dos fenómenos propios de la diferenciación terminal.

20

- 1) La filagrina participa en la agregación de la queratina durante la formación de las microfibrillas empaquetadas;
- 2) Los monómeros de filagrina son componentes de la envoltura cornificada o EC (envoltura situada en la

superficie interna de la membrana plasmática de los corneocitos y responsable de las propiedades impermeables de la piel junto con la matriz lipídica intercorneocitaria);

3) Los monómeros se deterioran completamente en las capas superiores de la capa córnea para producir una mezcla de aminoácidos higroscópicos (NMFs o Factores Naturales de Hidratación) que tienen una función importante en el mantenimiento de la hidratación de la epidermis³².

En las patologías que cursan con xerosis o sequedad de la piel (dermatitis atópica, ictiosis) se ha detectado una disminución de la profilagrina³³.

Según Proksch et al³⁴, seguir la expresión de la filagrina es una buena manera de controlar la función de barrera y/o el nivel de hidratación de la capa córnea. En las revistas de dermatología es el único marcador de hidratación de las capas superiores con importancia. En la clínica sin embargo es un marcador que se utiliza tras la medida de TEWL (pérdida de agua transepidérmica).

La involucrina es, al igual que la filagrina y la loricrina, un marcador de diferenciación terminal. Es una proteína de la envoltura cornificada (EC) que es el objetivo de las transglutaminasas (TGM), en especial de la TGM1. La TGM1 se encarga de oligomerizar la involucrina durante las etapas iniciales de la formación de la envoltura cornificada y en

las etapas más tardías de su formación; la involucrina se asocia a las ceramidas³⁵. El marcado se localiza en la epidermis a partir de las capas superiores de la capa espinosa hasta la capa granulosa y las primeras capas del estrato córneo.

- Efecto del tratamiento tópico con extracto de uchuva en explantes de piel humana

-Material y método:

Denominación: Explante de piel humana mamaria extraído de una mujer caucásica de 51 años (Biopredic - 35000 RENNES).

Número: Realización de 9 punchs de piel limpia de 1 cm de diámetro

Condiciones de cultivo: 37° C, 5% de CO₂

Medio de cultivo: Medio DMEM 4,5 g/L de glucosa, suplementado y con antibióticos (penicilina-estreptomicina-anfotericina)

- Productos testados

Extracto de uchuva obtenido según el ejemplo 3 diluido al 0,05% y al 0,01% (p/v) en aceite de parafina. Se ha utilizado el solvente TRIGLICÉRIDOS C8C10 55/45 (Código EC-09-271).

- Método de cultivo y tratamiento de explantes

La grasa de los explantes se eliminó en el momento de su recepción. Con un sacabocados se obtuvieron discos circulares de piel de 1 cm de diámetro. En una placa de seis pocillos, se colocó una rejilla de acero inoxidable de 1,6 cm de

diámetro en 5 ml de medio de cultivo. Cada explante cultivado se depositó sobre su rejilla de forma que quedara sumergido en el medio de cultivo dejando la epidermis al aire. Los explantes se cultivaron 48 horas sin cambiar el medio de cultivo. Los diferentes tratamientos se realizaron por depósito tópico de 10 µL de las preparaciones objeto del ensayo en el D0 y en el D1. Cada condición experimental se repitió en 3 punches.

Se han cultivado explantes de control de la misma manera que los explantes tratados. Los tratamientos se realizaron por depósito tópico de 10 µL del solvente TRIGLICÉRIDOS con una concentración de 0,05%.

- Inmunomarcado *in situ*

Transcurrido el tiempo de cultivo, se recogieron los explantes y después se dividieron en dos partes iguales con ayuda de un escalpelo. Una de las mitades se congeló en tejido TeckTM (Sakura) con isopentano enfriado en nitrógeno líquido y se conservó a -80° C en espera del inmunomarcador. La otra mitad se conservó en formol tamponado al 4%.

Con un criotomo se practicaron cortes transversales de 5 µm de grosor en cada explante. Los cortes se dejaron secar al aire. Tras rehidratarlos con PBS, los cortes se incubaron durante una hora con la solución de anticuerpos primarios preparada en una solución (PBS- BSA-Tween). Tras varios

lavados sucesivos, los anticuerpos primarios se cambiaron por un anticuerpo secundario unido a una sonda FITC al 1/100 de la forma comercial. Los núcleos celulares se marcaron con el colorante fluorescente DAPI.

- 5 Para recoger las secciones de piel se utilizaron portaobjetos de poli-lisina.

- Observaciones microscópicas

Cada sección de piel se observó con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 con un aumento de 20X. Para
10 cada sección se tomaron dos fotografías con una cámara Olympus DP72® controlada por el software Cell F. Los clichés se identificaron de la siguiente forma: Fecha del marcado - Condición de tratamiento - Número de imagen - Marcador. La contracoloración de los núcleos se realizó con un marcador
15 nuclear DAPI. Con un software de tratamiento de imagen, el color de los núcleos se transformó de azul a rojo. En cada condición de tratamiento de la epidermis se evaluó visualmente la intensidad del marcado con un aumento de x10. La escala de evaluación era la siguiente:

20

Marcado muy débil	1
Marcado débil	2
Marcado moderado	3
Marcado fuerte	4

Los datos obtenidos se analizaron y presentaron en histogramas donde se comparaban con las condiciones de control del solvente Triglicéridos.

- Resultados

- 5 Todos los marcadores se localizaron a nivel de las capas superiores de la epidermis (espinosa, granulosa o córnea).

- Inmunomarcador filagrina

En la gráfica 5A se muestran los resultados de las evaluaciones realizadas.

- 10 El análisis de los datos de la expresión del marcador filagrina indica un aumento de la dosis asociada a la cantidad de fluorescencia en los explantes tratados con el extracto de uchuva a 0,01% (+21%) y 0,05% (+37%) en comparación con el grupo de control del solvente.

- 15 - Inmunomarcador involucrina

- En la gráfica 5B se muestran los resultados de las evaluaciones realizadas. El análisis de los datos de expresión del marcador INVOLUCRINA indica un aumento considerable de la dosis asociada a la cantidad de fluorescencia en los explantes tratados con el extracto de uchuva a 0,01% (+64%) y 0,05% (+86%) en comparación con el grupo de control.
- 20

- Conclusión

Los resultados de este estudio han demostrado que el

tratamiento tópico de explantes de piel cultivados durante 48 horas con extracto de uchuva aumenta la expresión de las proteínas responsables de la hidratación y el efecto barrera de la piel (la filagrina y la involucrina, respectivamente).

5 El aumento de la expresión provocada por el extracto de uchuva ha sido mayor en la involucrina que en la filagrina. La expresión máxima de estas proteínas se ha observado siempre con una concentración de 0,05%. Según estos resultados, el extracto de uchuva de la invención tiene un
10 efecto hidratante y estructurante sobre la epidermis.

Ejemplo 23: Ensayos que demuestran el poder despigmentante de la piel del extracto de uchuva

El posible efecto despigmentante del extracto de uchuva se
15 evaluó en melanocitos epidérmicos humanos normales (NHEM). Al cabo de 10 días de incubación estimulada por L-tirosina se evaluó el efecto del extracto de uchuva sobre la síntesis de melanina. En este ensayo, la molécula inhibidora de referencia es el ácido lipoico, cuyo mecanismo de acción
20 inhibe la expresión del factor de transcripción MITF (factor de transcripción asociado con microftalmia). Este factor de transcripción es el principal regulador de la expresión de la tirosinasa y su inhibición provoca la reducción de la expresión de la tirosinasa, enzima implicada en la síntesis

de melanina. Se sembraron los melanocitos en una placa de 24 pocillos y se cultivaron en medio de cultivo durante 24 horas. Este medio se cambió después por otro (Medium 254 complementado con PMA free HMGS-2 + penicilina 50 U/ml -
5 estreptomicina 50 µg/ml) complementado con L-tirosina (a 1 mM) conteniendo o no (control estimulado) el compuesto o la referencia (ácido lipoico ensayado a 5 µg/ml). Paralelamente se preparó un grupo de control no estimulado. Posteriormente las células se incubaron durante un total de 10 horas,
10 renovándose los tratamientos a los 3 y 7 días de incubación. Tras la incubación, se extrajo la melanina por lisis celular con una solución de NaOH 0,5 N. La densidad óptica (DO) de las muestras se midió en 405 nm, y después se determinó la cantidad de melanina comparada con una gama de melanina
15 exógena (curva de melanina que incluye patrones de 0,39 a 100 µg/ml). Los resultados se expresaron en µg/ml de melanina, como porcentaje de control estimulado y como porcentaje de inhibición. El tratamiento de los melanocitos epidémicos humanos normales (NHEM) con L-tirosina, probada a 1 mM,
20 estimuló intensamente la síntesis de melanina. La referencia, ácido lipoico, testada a 5 µg/ml, inhibió intensamente la estimulación inducida por la L-tirosina (108% de inhibición). Era el efecto esperado y permitió dar por buena la prueba. Las concentraciones de extracto de uchuva que iban a

someterse a la prueba se seleccionaron tras una prueba preliminar de citotoxicidad:

- Tipo celular: NHEM en medio de cultivo
 - 5 - Tiempo de incubación: 72 + 96 + 72 horas
 - Parámetros de evaluación: Reducción del MTT y observaciones morfológicas al microscopio.
- 10 Al término del tratamiento, las células se incubaron con MTT (sal de tetrazolio) cuya transformación en cristales azules de formazano es proporcional a la actividad de la succinato deshidrogenasa, una enzima
- 15 mitocondrial. Tras dissociar las células y disolver el formazano añadiendo DMSO, se midió la densidad óptica (DO), representativa del número de células vivas y de su actividad metabólica, 2con un lector de microplacas de 540 nm (VERSAmax,
- 20 Molecular Devices).

Las concentraciones seleccionadas para continuar el estudio son: 0,5 - 1,6 - 5 µg/ml que corresponden respectivamente a $5 \cdot 10^{-5}$, $16 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-5}\%$. En las condiciones experimentales de

este estudio, el extracto de uchuva probado a 5 µg/ml inhibió moderadamente la síntesis de melanina (40% de inhibición). El compuesto no presentaba el mismo efecto probado a concentraciones más bajas (0,5 y 1,6 µg/ml). En el esquema de la figura 6 se muestran los resultados. En las condiciones experimentales de este estudio, el extracto de uchuva presentó un efecto despigmentante moderado, solo observado en la concentración más fuerte (5 µg/ml).

La tabla de abajo recoge la correspondencia de las concentraciones del extracto de uchuva probadas en los ejemplos 21 a 23 (ppm y % de peso respecto a la concentración total de la composición).

OBJETIVOS		CONC. PROBADAS ppm	CONC. PROBADAS %
15	Colágeno I	0,8	8.10 ⁻⁵
		1,6	16.10 ⁻⁵
		3,2	32.10 ⁻⁵
		0,5	5.10 ⁻⁵
20	Colágeno I	1	10.10 ⁻⁵
		2	20.10 ⁻⁵
		0,8	8.10 ⁻⁵
	Colágeno III	1,6	16.10 ⁻⁵
		3,2	32.10 ⁻⁵
	Colágeno IV	0,4	4.10 ⁻⁵
		0,8	8.10 ⁻⁵

5	Elastina	0,5	$5 \cdot 10^{-5}$
		1	$10 \cdot 10^{-5}$
		2	$20 \cdot 10^{-5}$
10	Fibrilina-1	0,5	$5 \cdot 10^{-5}$
		1	$10 \cdot 10^{-5}$
		2	$20 \cdot 10^{-5}$
15	Nivel de metilación	0,5	$5 \cdot 10^{-5}$
		1	$10 \cdot 10^{-5}$
		2	$20 \cdot 10^{-5}$
20	Filagrina	100	0,01
		500	0,05
		100	0,01
20	Involucrina	500	0,05
		0,5	$5 \cdot 10^{-5}$
		1,6	$16 \cdot 10^{-5}$
20	Melanina	5	$50 \cdot 10^{-5}$

Referencias bibliográficas

5

1. Les esters de sucres : voies de synthèse et potentialités d'utilisation, Piccicuto et al. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2001, 5, 209-219

10

2. Domaines d'applications des sucroesters et sucroglycerides, Mireille Cecchin, DESS ingénierie documentaire, rapport bibliographique, 2001.

3. Preparative isolation and structural characterization of sucrose ester isomers from oriental tobacco, Jia et al. *Carbohydrate Research* 2013, 372, 73-77

15

4. Characterization of 2,3,4,3'-tetra-O-acylated sucrose esters associated with the glandular trichomes of *Lycopersicon typicum* King et al. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 469-473

20

5. New Multidrug resistance modulators from *Atractylodes lanceae* Rhizoma Murakami et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 2629-2632

6. Labdanes ans sucrose Ester from *Physalis sordida*, Maldonado et al. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 1511-1513

7. Oligosaccharide esters from the roots of *Polygala*

arillata, Kobayashi et al. *J. Nat. Prod.* 2000, 63,
1066-1069

8. Synthesis and antitumor activity of lapathoside D and
its analogs, Panda et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 53,
1-12
9. Direct inhibition of elastase and matrix
metalloproteinases and stimulation of biosynthesis of
fibrillar collagens, elastin, and fibrillins by
xanthohumol (*Journal of Cosmetic Science*, Volume 61,
Issue 2, Pages125-132, Journal 2010.)
10. From elastin to elastic fibers, part I. The *in
vitro* effects of a natural dipeptide on the biological
cascade.
11. A novel anti-ageing mechanism for retinol:
induction of dermal elastin synthesis and elastin fibre
formation *International Journal of Cosmetic Science*
Volume 33 Issue 1 Pages 62-69 Journal 2011
12. Matrix proteins of the papillary dermis - primary
targets of intrinsic dermal aging? *Global Ingredients &
Formulations Guide 2009* Pages131-142 Conference 2009
13. Matrix proteins of the papillary dermis - primary
targets of intrinsic dermal aging? *IFSCC Magazine*
Volume 11 Issue 3 Pages 225-229 Journal 2008
14. Fibrillines et fibrillinopathies, Gwenaëlle Collod

et al., Médecine et Science n°10, vol. 12, p. 1077 -
1086, octobre 1996

15. Les filaments perlés : structure, fonctions et
maladies associées, Eric Hanssen et al., Médecine et
5 Science n°3, vol. 17, p. 327 -335, mars 2001
16. Stiff skin syndrome cause found, P.J. Couke et al.,
18 mars 2010
17. Fibrillin Assembly Requires Fibronectin, L.
Sabatier et al., Molecular Biology of the Cell, Vol.
10 20, 846-858, February 1, 2009.
18. Dissecting the Fibrillin Microfibril: Structural
Insights into Organization and Function, S. A. Jensen
et al., Structure Review 20, Cell Press, February 8,
2012
- 15 19. Type VII collagen gene expression by human skin
fibroblasts and keratinocytes in culture: influence of
donor age and cytokine responses, Y.K. Chen et al., J
Invest Dermatol. 1994 Feb;102(2):205-9.
20. WO 2001/007006 A1, ASSOCIATION OF FIBRILLIN AND A
20 CYANOPHYTA EXTRACT, PREPARATION METHOD AND USE AS
MEDICINE, PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE
21. Epidermal growth factor and multiplication of
cultured human epidermal keratinocytes, Nature 1977,
265, 421-423

22. Retinoid-Responsive transcriptional changes in epidermal Keratinocytes, Cellular Physiology 2009, 220, 427-439
- 5 23. Silybin from Silybum Marianum Seeds inhibits confluent-Induced keratinocytes differentiation as effectively as retinoic acid without inducing inflammatory cytokine, Journal of clinical biochemistry and nutrition, 2009, 45, 178-184.
- 10 24. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues, Carmen M. Koch and Wolfgang Wagner, AGING october 2011, Vol. 3 No 10)
25. Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the human epidermis, Raddatz et al.
- 15 Epigenetics & Chromatin 2013, 6:36
26. Aging, rejuvenation and epigenetic reprogramming : resetting the aging clock, Rando TA, Chang HY, the Glenn Laboratories for the Biology of Aging, Stanford University School of Medicine, Cell. 2012 Jan 2; 148(1-20 2):46-57.doi: 10.1016/j.cell.2012.01.003.
27. Epigenetic control of aging, Muñoz-Najar U., Sedivy JM., Department of Molecula Biology, Cell Biology and Biochemistry, Brown University, Providence, Rhode Island USA, Antioxid Redox Signal 2011 Jan 15; 14(2):241-59.

Doi: 10.1089/ars.2010.3250.Epub 2010 Nov 22.

28. Epigenetics and aging, D'Aquila P., Rose G., Bellizzi D., Passarino G., Department of Cell Biology, University of Calabria, Rende Italy, *Maturitas* 2013 Feb; 74(2): 130-136. Doi: 10.1016/j.maturitas.2012.11.005. Epub 2012 Dec 12.
29. Epigenetic factors in aging and longevity, Gravina S., Vijq. J., Depratment of Genetics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx New-York USA, *Pflugers Arch.* 2010 Jan; 459(2): 247-58. Doi: 10.1007/s00424-009-0730-7. Epub 2009 Sep 19.
30. Modulation of gene expression as a new skin anti-aging strategy, Talbourdet S., Sadick NS., Lazou K. et co., LVMH Recherche - Parfums Christian Dior, France, *J. Drugs Dermatol.* 2007 Jun;6(6 suppl):s25-33.
31. Experimental approaches to the study of epigenomic dysregulation in ageing, Thompson RF., Fazzari MJ., Greally JM., Department of Genetics and Center for Epigenomics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx New-York USA, *Exp.Gerontol.* 2010 Apr;45(4):225-68. Doi: 10.1016/j.exger.2009.12.013. Epub 2010 Jan 10.
32. KH Choi et al, *Exp Mol Med*, 37, 546, 2005.
33. Ginger RS et al., *Arch Dermatol Res* 297 :235-241, 2005; Rawlings AV and Matts PJ, *JID*, 124 :1099-1110,

2005.

34. Revue dans Proksch E et al, *Exp Dermatol*, 17 :1063-1072, 2008.

35. Hitomi K. Transglutaminases in skin epidermis, *Eur J Dermatol*, 2005,15 :313.