

COMPOSICIÓN COSMÉTICA

La presente invención se relaciona con composiciones cosméticas que comprenden un extracto del fruto de Gardenia.

5

En la sociedad moderna, la tecnología digital es cada vez más común, llevando a una exposición aumentada a la luz azul.

La luz azul es un tipo de luz de alta energía y es parte del espectro de luz visible, que tiene una longitud de onda entre 400–495 nm. Las fuentes de luz azul usuales incluyen teléfonos móviles, computadores, tabletas, televisiones y luces. Mucho de la exposición deriva de diodos emisores de luz (LEDs).

Las personas están cada vez más expuestas a la luz azul a través de la tecnología de uso diario. El estudio del Pew Research Center en 2015 determinó que el 68 % de los adultos en Estados Unidos tiene un teléfono inteligente y que el 45 % posee una tableta. El estudio determinó también que los niveles de posesión de tecnología varían con la edad; el 86 % de los estadounidenses entre 18-29 años y el 83 % de estos entre 30-49 años poseen teléfonos inteligentes. En contraste, las tasas de propiedad de computadores son más bajas para estadounidenses de mayor edad.

La luz azul parece afectar la piel y puede dañar las células. Más aún, Dong *et al.*, demostraron que la luz azul interrumpe el ritmo circadiano, afectando la calidad de vida de las personas.

La melatonina es una hormona bien conocida relacionada con el sueño secretada de forma natural por nuestro organismo (cerebro y piel), en un ciclo diario. Su pico de producción sucede en la noche y juega un papel crucial en nuestra capacidad de dormirnos y en nuestra calidad de sueño. Además, la melatonina también actúa como un poderoso agente antienviejecimiento, gracias a sus fuertes propiedades antioxidantes, y a desencadenar la cascada de defensas biológicas a través de su unión al receptor de membrana de la melatonina MT1R.

La exposición a la luz azul lleva a perturbación en el ritmo de producción de melatonina, causando envejecimiento de la piel (pérdida de defensas antioxidantes y daños a las mitocondrias y una perturbación de las funciones relacionadas con el sueño (dificultades para dormirse, despertarse muchas veces durante la noche, fatiga por la mañana). Esto resulta en un envejecimiento prematuro de la piel, que está más expuesta a agresiones externas y no es capaz de restaurarse a sí misma

durante las fases de reposo del cuerpo humano.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proveer un medio cosmético para prevenir los efectos negativos causados por la exposición a luz azul.

5

Este problema ha sido resuelto por el agente activo cosmético y la composición cosmética de la presente invención.

10

En un primer aspecto, la presente invención provee de un agente activo cosmético que comprende un extracto del fruto de *Gardenia*.

15

La planta de *Gardenia*, que también es llamada jazmín del cabo o *danh-danh*, es una planta de floración perenne de la familia del café *Rubiaceae*. Tiene su origen en Asia y se encuentra más comúnmente creciendo silvestre en Vietnam, el sur de China, Corea, Taiwán, Japón, Myanmar, India y Bangladesh. Existen alrededor de 250 tipos de *Gardenia* en el mundo.

20

A lo largo de la presente divulgación, el término “*Gardenia*” pretende abarcar todas las especies del género *Gardenia*, incluyendo *Gardenia jasminoides*, *Gardenia angustifolia*, *Gardenia augusta*, *Gardenia florida*, *Gardenia grandiflora*, *Gardenia radicans*, *Gardenia longisepala*, *Gardenia maruba*, y *Gardenia pictorum*, y en particular *Gardenia jasminoides* J. Ellis.

25

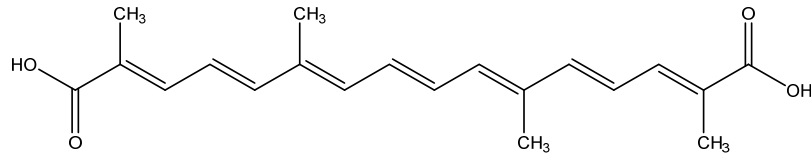
Tradicionalmente, el fruto de *Gardenia* ha sido usado en aplicaciones orales de medicina tradicional para el tratamiento de inflamación, cefalea, edema, fiebre, trastornos hepáticos e hipertensión. Las flores fragantes son usadas también para aromatizar el té, e incluso en ocasiones son consumidas al natural como manjar, en escabeche o conservadas en miel. Actualmente, las plantas de *Gardenia* son explotadas principalmente para aditivos alimenticios, colorantes y como planta ornamental.

30

Los frutos de *Gardenia* tienen un color rojo debido a los pigmentos carotenoides naturales. En particular, contienen crocetina, crocina y otros ésteres de crocetina.

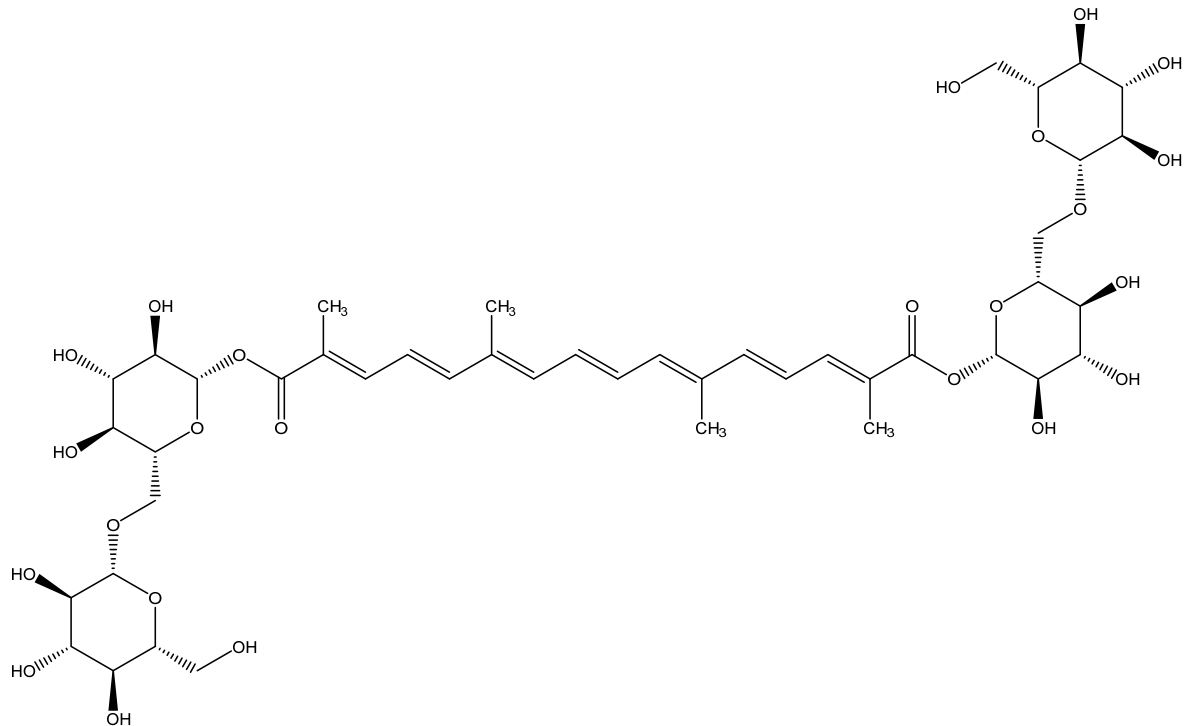
El término “Crocinas” como se usa a lo largo de esta divulgación, significa abarcar la aglicona crocetina, su derivado di-gentiobiósido crocina, así como otros mono o diglucósidos de crocetina y cualquier otro derivado de crocetina que tiene el núcleo ácido 8,8'-diapocarotenodiólico.

La crocetina es un ácido dicarboxílico apocarotenóide que se encuentra en la flor de *Crocus sativus* L. y en los frutos de *Gardenia jasminoides*. Tiene la siguiente estructura:



5

La crocines es el diéster formado del disacárido gentiobiosa y del ácido dicarboxílico crocetina. Tiene la siguiente estructura:



La crocina es uno de los componentes principales en el extracto del fruto de *Gardenia*.

10

Las crocinas son particularmente interesantes ya que están entre los pocos carotenoides solubles en agua, que hace sean adecuados como un agente colorante para aplicaciones alimenticias.

15

Una de las desventajas clave de las Crocinas es su notoria inestabilidad, en particular debido a la degradación bajo la influencia de la luz, a la disminución del pH y al aumento de la temperatura. Este hecho hace que el uso cosmético del extracto del fruto de *Gardenia*, y de las Crocinas en general, sea difícil, sino imposible.

Por lo tanto, es importante estabilizar el extracto del fruto de Gardenia dentro de un agente activo cosmético.

- 5 En consecuencia, el agente activo cosmético de la presente invención comprende además un disolvente, que es capaz de estabilizar el extracto, y en particular las Crocinas contenidas en este.

De manera sorprendente, se ha determinado que la estabilidad de las Crocinas se puede mejorar por el agregado de un disolvente eutéctico que tiene un pH de al menos 5. Este hallazgo ha sido
10 confirmado por estudios de estabilidad a largo plazo (ver más adelante el Ejemplo 2).

Por lo tanto, el disolvente usado en el agente activo cosmético de la presente invención es un disolvente eutéctico que tiene un pH de al menos 5. El disolvente eutéctico permite una buena solubilidad del extracto del fruto de Gardenia, y también para su estabilización, en particular de las
15 Crocinas contenidas en estas.

Los disolventes eutécticos son conocidos en general. Consisten en muchos componentes, usualmente cada uno a un intervalo de concentración específico, y poseen un punto de fusión más bajo que los componentes individuales.

20

El agente activo cosmético de la presente invención es para aplicación tópica.

Se ha determinado que el agente activo cosmético de la presente invención tiene muchos efectos ventajosos, que han sido probados *in vitro* y en estudios clínicos (ver, más adelante los ejemplos).

25

En particular, se determinó que tiene propiedades antienvjecimiento y que mejora la calidad del sueño, en particular de personas con alta exposición a la luz azul.

Sin estar limitados por la teoría, se considera que el agente activo cosmético de la presente invención protege la producción cutánea de melatonina cuando la piel es expuesta a estrés digital, es decir, a luz azul, de ese modo previene el envejecimiento prematuro de la piel.

30

Se ha determinado que la crocina presente en el agente activo cosmético de la presente invención no solo protege el ciclo natural de la melatonina de la piel, sino que también se puede convertir en

crocetina por la microflora de la piel. Con base en un estudio de microbioma (ver más adelante el ejemplo 3), la crocina se transforma completamente en crocetina sin aproximadamente 210 horas en cultivo.

- 5 Sin estar limitados por la teoría, el solicitante considera que la crocetina es capaz de unirse al principal receptor de melatonina MT1R, considerando que la crocina no lo hace. Esta hipótesis está soportada en estudios de modelado molecular con base en estructuras cristalográficas de MT1R, crocina, crocetina y melatonina, que se obtuvieron del Banco de Datos de Proteínas (www.rcsb.org). Un cálculo de la interacción molecular para cada una de las moléculas con MT1R mostró que la crocetina tiene
10 una puntuación de afinidad positiva de 3.6232, que es muy cercana a la de la melatonina (5.6553), al mismo tiempo que la crocina tiene una puntuación de afinidad negativa de -36.4141.

- De este modo, se considera que la crocetina es capaz de activar los receptores de melatonina de la piel (MT1). Por lo tanto, gracias a su activación por el microbioma de la piel, el agente activo cosmético
15 de la presente invención puede tomar una parte activa en defensa de la piel y en los mecanismos de reparación.

- Las pruebas clínicas (ver ejemplo 8 a continuación) han mostrado que el agente activo cosmético de la presente invención revierte los signos visibles del envejecimiento (número de arrugas -21 % en
20 comparación con el placebo). Por lo tanto, es perfectamente adecuado para prevenir y curar el envejecimiento prematuro de la piel. Este hallazgo se confirmó también por una autoevaluación de panelistas, durante la cual el 80 % de los voluntarios estableció que su piel estaba más hidratada (40 % para el placebo) y 75 % de los voluntarios estableció que su piel estaba más suave (45 % para el placebo).

- 25 Más específicamente, el agente activo cosmético de la presente invención es capaz de proteger la red mitocondrial y la propagación celular *in vitro* (ver más adelante los ejemplos 5 y 6). Se mostró que la exposición a la luz azul daña la red mitocondrial. En presencia del agente activo cosmético de la presente invención, la red se fragmenta menos. La propagación celular también está afectada
30 significativamente por la luz azul, pero nuevamente, el agente activo cosmético de la presente invención es capaz de prevenir este efecto.

El agente activo cosmético de la presente invención también es capaz de la reducción del contenido oxidado de proteínas *ex vivo* (ver más adelante el ejemplo 7). Después de la exposición a la luz azul,

el contenido oxidado de proteína en explantes de piel humana aumenta significativamente. Este efecto se puede revertir por el agente activo cosmético de la presente invención.

Además, se determinó que el agente activo cosmético de la presente invención conserva el ciclo de la melatonina *in vitro* (ver más adelante el ejemplo 4), asegurando la liberación de la melatonina durante la noche y, de este modo, protegiendo la piel contra el estrés digital.

Se ha determinado además que el agente activo cosmético de la presente invención tiene un efecto positivo en la calidad del sueño, contribuyendo de esa manera al bienestar general.

10

En particular, se ha determinado que una aplicación tópica del agente activo cosmético reduce el número de despertares durante la noche y aumenta la facilidad para conciliar el sueño (ver más adelante los estudios clínicos en el ejemplo 8) Se considera que el agente activo cosmético actúa como una molécula tipo melatonina vegetal, activando los mecanismos biológicos conectados al ritmo circadiano.

15

En una modalidad de la presente invención, el disolvente eutéctico tiene un pH de al menos 5.5, más preferentemente de al menos 6, y lo más preferentemente de al menos 7. Gracias al pH más alto, se mejora la estabilización de las Crocinas en el extracto del fruto de Gardenia. Sin embargo, para aplicaciones para el cuidado de la piel, es deseable que el pH no sea tan alto, por ejemplo, no mayor que 10, más preferentemente no mayor que 9, y lo más preferentemente no mayor que 8.

20

En una modalidad de la presente invención, los componentes del disolvente eutéctico son de origen natural. Los disolventes eutécticos de los componentes de origen natural son conocidos generalmente y se describen usualmente como “disolventes eutécticos profundos naturales”, o NaDES [por sus siglas en inglés].

25

Más preferentemente, los componentes del disolvente eutéctico son todos de origen 100 % natural de conformidad con la norma ISO16128.

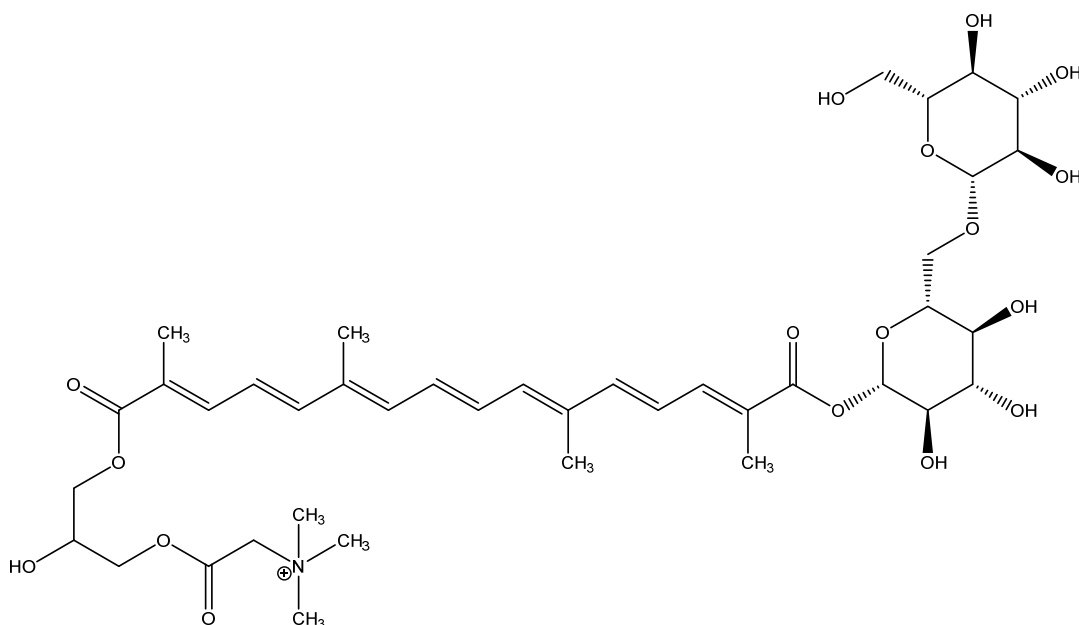
30

En una modalidad de la presente invención, el disolvente eutéctico comprende betaína, glicerol y agua. Se ha determinado que este disolvente eutéctico es particularmente adecuado para la solubilización y estabilización del extracto del fruto de Gardenia. También, la betaína puede actuar como agente humectante en aplicaciones para el cuidado de la piel.

En una modalidad de la presente invención, el disolvente eutéctico comprende de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 % en peso de betaína, de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 % en peso de glicerol, y de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 % en peso de agua, más preferentemente aproximadamente 35 % en peso de betaína, aproximadamente 40 % en peso de glicerol, y aproximadamente 25 % en peso de agua.

En una modalidad particularmente preferida, el disolvente eutéctico consiste en 34.6 % en peso de betaína, 40.4 % en peso de glicerol, y 25.0 % en peso de agua. Este disolvente eutéctico tiene un pH de aproximadamente 7.45.

20 Sin estar limitados por la teoría, el solicitante considera que en presencia de un disolvente eutéctico basado en betaína, glicerol y agua, tiene lugar una transesterificación en que al menos una de las fracciones gentiobiósidas de la crocina se reemplaza por una fracción glicerol-betaína para formar el siguiente aducto:



Esta hipótesis ha sido soportada por análisis de NMR [por sus siglas en inglés] en 2D (NOESY y HSQC [también por sus siglas en inglés]).

- 5 Este derivado también pretende ser incluido en el término “Crocinas” como se definió anteriormente.

En una modalidad alternativa, el disolvente eutéctico es una mezcla de pentilenglicol, betaína y agua. En particular, el disolvente eutéctico puede comprender de aproximadamente 35 a aproximadamente 50 % en peso de pentilenglicol, de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 % en peso de betaína, y de aproximadamente 20 a aproximadamente 35 % en peso de agua, más preferentemente aproximadamente 44 % en peso de pentilenglicol, aproximadamente 29 % en peso de betaína, y aproximadamente 28 % en peso de agua. En una modalidad particularmente preferida, el disolvente eutéctico consiste en 43.7 % en peso de pentilenglicol, 28.8 % en peso de betaína, y 27.5 % en peso de agua. Este disolvente eutéctico tiene un pH de aproximadamente 6.85.

15

La concentración del extracto del fruto de Gardenia en el agente activo cosmético de la presente invención debe seleccionarse de forma que los efectos ventajosos descritos anteriormente se puedan lograr.

- 20 En una modalidad de la presente invención, la concentración del extracto del fruto de Gardenia en el agente activo cosmético es de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 % en peso, más preferentemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 1 % en peso, y lo más preferentemente aproximadamente 0.1 % en peso.

- 25 Para asegurar la actividad del agente activo cosmético de la presente invención, se prefiere un contenido relativamente alto en Crocinas en el extracto del fruto de Gardenia. Como se puede observar del análisis de extractos del fruto de Gardenia disponible (ver más adelante el ejemplo 1), el contenido de Crocina puede variar de un proveedor a otro.

- 30 En una modalidad de la presente invención, el extracto de fruto de Gardenia comprende al menos 1 % en peso de Crocinas, más preferentemente al menos 10 % en peso de Crocinas, y lo más preferentemente al menos 25 % en peso de Crocinas.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición cosmética que

comprende el agente activo cosmético de la presente invención y un excipiente cosméticamente aceptable. La composición cosmética de la presente invención está destinada para aplicación tópica.

5 Cualesquier excipientes usados comúnmente en la preparación de preparaciones cosméticas para uso en la piel humana se pueden emplear en la presente invención. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a los ingredientes que pueden influir las propiedades organolépticas, la penetración de la piel y la biodisponibilidad del extracto de fruta de Gardenia. Más específicamente, estos incluyen líquidos, tales como agua, aceites o tensoactivos, incluyendo aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como por ejemplo, y sin limitarse a ellos, aceite de cacahuate, aceite de soya, 10 aceite mineral, aceite de ajonjolí, aceite de ricino, polisorbatos, ésteres de sorbitán, sulfatos de éter, sulfatos, betainas, glucósidos, maltósidos, alcoholes grasos, nonoxinolos, poloxámeros, polioxietilenos, polietilenglicoles, dextrosa, glicerol, digitonina y similares.

La formulación para aplicación tópica a la piel puede tomar cualquier forma física. Por ejemplo, la 15 composición cosmética, y en particular, la composición para el cuidado de la piel, puede estar en forma de una composición liposómica, liposomas mixtos, oleosomas, niosomas, etosomas, milipartículas, micropartículas, nanopartículas y nanopartículas de lípidos sólidos, vesículas, micelas, micelas mixtas de tensoactivos, micelas mixtas de tensoactivo fosfolípido, miliesferas, microesferas y nanoesferas, lipoesferas, milicápsulas, microcápsulas y nanocápsulas, así como microemulsiones y 20 nanoemulsiones, que se pueden agregar para lograr una mayor penetración del extracto del fruto de Gardenia.

La composición cosmética, y en particular, la composición para el cuidado de la piel se puede producir en cualquier forma sólida, líquida o semisólida útil para la aplicación a la piel de forma tópica o por 25 aplicación transdérmica. De este modo, estas preparaciones de aplicación tópica y transdérmica incluyen, pero no se restringen a cremas, emulsiones múltiples, tales como y no restringidas a emulsiones de aceite y/o silicona en agua, emulsiones de agua en aceite y/o silicona, emulsiones de tipo agua/aceite/agua o agua/silicona/agua y aceite/agua /aceite o silicona/agua, microemulsiones, emulsiones y/o soluciones, cristales líquidos, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, 30 leches, bálsamos, espumas, lociones acuosas u oleosas, geles acuosos u oleosos, cremas, soluciones hidroalcohólicas, soluciones hidroglicólicas, hidrogeles, linimentos, sueros, jabones, mascarillas faciales, sueros, películas de polisacáridos, ungüentos, espumas, pomadas, pastas, polvos, barras, lápices y pulverizadores o aerosoles (pulverizador), incluyendo las formulaciones para dejar y para enjuagar.

De este modo, la presente invención también proporciona una composición para el cuidado de la piel, y en particular, una composición antienvjecimiento para el cuidado de la piel.

- 5 Los efectos ventajosos del agente activo cosmético de la presente invención, y de este modo también de la composición cosmética de la presente invención, se han descrito con anterioridad a detalle.

Las modalidades específicas del agente activo cosmético son ventajosamente aplicadas a las composición cosmética.

10

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona también un método para reducir los signos del envejecimiento en la piel, que comprende la etapa de aplicar de forma tópica el agente activo cosmético o la composición cosmética de la presente invención a la piel, en particular a la piel facial. Los efectos ventajosos se han descrito con anterioridad a detalle y están soportados más adelante
15 por los ejemplos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona también un método para proteger la piel contra el estrés oxidativo, que comprende la etapa de aplicar de forma tópica el agente activo cosmético o la composición cosmética de la presente invención a la piel, en particular a la piel facial.
20 Los efectos ventajosos se han descrito con anterioridad a detalle y están soportados más adelante por los ejemplos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona también un método para proteger la piel contra los efectos de la luz azul, que comprende la etapa de aplicar de forma tópica el agente activo cosmético o la composición cosmética de la presente invención a la piel, en particular a la piel facial. Los efectos ventajosos se han descrito con anterioridad a detalle y están soportados más adelante
25 por los ejemplos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona también un método no terapéutico para
30 proteger el ciclo de la melatonina de un individuo, que comprende la etapa de aplicar de forma tópica el agente activo cosmético o la composición cosmética de la presente invención a la piel, en particular a la piel facial. Los efectos ventajosos se han descrito con anterioridad a detalle y están soportados más adelante por los ejemplos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona también un método no terapéutico para mejorar el sueño de un individuo, que comprende la etapa de aplicar de forma tópica el agente activo cosmético o la composición cosmética de la presente invención a la piel, en particular a la piel facial. Los efectos ventajosos se han descrito con anterioridad a detalle y están soportados más adelante por los ejemplos.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona también con el uso de un extracto del fruto de Gardenia para mejorar el sueño de un individuo.

En particular, la presente invención se relaciona también con el uso del agente activo cosmético o de la composición cosmética de la presente invención para mejorar el sueño de un individuo.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1: Extracto del fruto de Gardenia

El extracto del fruto de Gardenia está disponible de forma comercial de muchos proveedores.

Para los presentes estudios, se obtuvieron extractos de Indfrag Bioscience Private Limited ("Extracto de Gardenia Florida", lotes Nos. GFP-ROE-14002 y GFP-ROE-19001; planta cultivada en la provincia de Anhui en China; de acuerdo con las especificaciones del proveedor, el extracto se obtiene del fruto *Gardenia Florida* por extracción en agua, fraccionamiento, concentración, secado y espolvoreado) y Yunnan Rainbow Bio-tech. Corp., Ltd ("Polvo amarillo de Gardenia", lote No. ZT180201, recibido el 6 de julio de 2018; planta cultivada en la provincia de Guangxi en China; de acuerdo con las especificaciones del proveedor, el extracto se obtiene del fruto de Gardenia (*Gardenia Jasminoides* Ellis) por extracción, filtración, refinado, concentración y secado por aspersión). Ambos productos están en forma de polvo, y son amarillentos a rojizos o parduzcos.

La autenticidad de los productos se confirmó por identificación macroscópica y microscópica, HPTLC, análisis de ADN (proveedor externo: Tru-ID), y HPLC de una muestra de fruto seco obtenida de cada proveedor.

Los extractos del fruto de Gardenia de ambos proveedores se analizaron aún más por HPLC-UV y LC-TOF para determinar su composición. Se determinó que la muestra de Indfrag contenía

aproximadamente 10 % en peso de Crocinas, en tanto que la de Yunnan Rainbow contenía aproximadamente 30 % en peso.

Los extractos del fruto de Gardenia se procesaron adicionalmente de la siguiente manera:

5

- molido
- extracción con agua (Yunnan Rainbow) o metanol/agua 75:25 (Indfrag)
- filtración
- adsorción y desorción con etanol (70%)

10

- concentración
- secado por aspersión con maltodextrina (solo para Yunnan Rainbow)

El material sólido obtenido de este modo se disolvió después en el solvente(s) deseado.

15 Ejemplo 2: Estudios de estabilidad

Se probó la estabilidad del extracto del fruto de Gardenia en diferentes disolventes en diferentes condiciones.

20

Estabilidad a largo plazo

La estabilidad a largo plazo se probó a temperatura ambiente y a 40 °C en dos diferentes disolventes eutécticos: (a) una mezcla de betaína, ácido láctico y agua, y (b) una mezcla de betaína, glicerol y agua. El pH de los disolventes solos es (a) 3.27 y (b) 7.45, respectivamente. Se probaron los extractos del fruto de Gardenia de Yunnan Rainbow (a1) y (b1) y Indfrag (a2) y (b2).

25

Los disolventes eutécticos se prepararon mezclando los componentes a 50 °C. Se agregó después 0.1 % en peso del extracto del fruto de Gardenia (en forma de polvo) y la composición obtenida se calentó a 80 °C durante 1 hora.

30

Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y a 40 °C, respectivamente, durante un periodo de 3 meses. La estabilidad se evaluó midiendo el pH, el índice Gardener y la densidad óptica a $\lambda_{\text{máx}}$ (en un intervalo de 250-600 nm). Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

	Tiempo	0	1 mes		2 meses		3 meses	
	Temperatura	rt	rt	40 °C	rt	40 °C	rt	40 °C
(a1) betaína / ácido láctico / agua (40:35:25 p/p)	pH	3.78	3.53	3.19	3.63	3.33	3.65	3.22
	Índice Gardener	13	11	11	11	10	11	10
	Densidad óptica	1.53	1.30	0.73	1.13	0.40	0.85	0.25
(a2) betaína / ácido láctico / agua (40:35:25 p/p)	pH	3.28	3.05	3.08	3.08	3.13	3.14	3.06
	Índice Gardener	11	11	10	10	10	10	10
	Densidad óptica	0.50	0.38	0.20	0.38	0.1	0.35	0.11
(b1) betaína / glicerol / agua (40.4:34.6:25 p/p)	pH	7.56	5.97	7.01	6.13	6.43	6.37	6.34
	Índice Gardener	13	12	11	12	11	12	11
	Densidad óptica	1.69	1.97	1.18	1.80	1.00	1.51	0.80
(b2) betaína / glicerol / agua (40.4:34.6:25 p/p)	pH	7.13	5.55	7.02	5.79	6.56	5.95	6.25
	Índice Gardener	11	11	10	11	10	10	10
	Densidad óptica	0.54	0.56	0.38	0.46	0.36	0.44	0.28

Como se puede observar de lo mencionado anteriormente, el extracto del fruto de Gardenia fue claramente más estable en la mezcla de betaína / glicerol / agua en comparación con la mezcla de betaína / ácido láctico / agua.

5

Muestras para estudios de luz solar ("Prueba solar") y temperatura elevada

El extracto del fruto de Gardenia (en forma de polvo; de Yunnan Rainbow) se disolvió en (c) agua y (d) se formó un disolvente eutéctico de betaína, glicerol y agua (35:40:25 p/p), respectivamente.

10

El disolvente eutéctico (d) se preparó al mezclar los componentes a 50 °C hasta que estuvieran completamente homogéneos.

Para cada uno de los disolventes, se agregó 0.1 % en peso de extracto del fruto de Gardenia y la composición obtenida se calentó a 80 °C durante 1 hora.

15

A T0, el color de las muestras se identificó de conformidad con CIELAB:

	L	a*	b*	C	h*
(c) agua	67.26	52.94	114.73	126.35	65.30
(d) betaína / glicerol / agua (35:40:25 p/p)	70.56	49.53	120.15	129.96	67.60

Luz solar ("Prueba solar")

20

Las muestras se irradiaron con 450 W/m² (300-800 nm) durante un periodo de 24 horas. Después de 8, 12, 18 y 24 horas, la estabilidad de las muestras se evaluó al medir el pH, el cambio en color (dE2000), el índice Gardener y la densidad óptica a 440 nm ($\lambda_{\text{máx.}}$). Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

5

	Tiempo a 450 W/m ²	0	8 h	12 h	18 h	24 h
(c) agua	pH	7.84	7.69	7.72	7.43	7.37
	dE2000	--	6.73	7.49	5.33	7.48
	Índice Gardener	13	12	12	13	12
	Densidad óptica	2.15	1.18	1.15	1.10	1.03
(d) betaína / glicerol / agua (35:40:25 p/p)	pH	8.17	8.23	8.27	8.11	8.06
	dE2000	--	0.85	1.52	0.44	0.70
	Índice Gardener	13	13	13	13	13
	Densidad óptica	1.98	1.77	1.86	1.93	1.88

Como se puede observar de lo mencionado anteriormente, el extracto del fruto de Gardenia es perfectamente estable en el disolvente formado de betaína / glicerol / agua, en tanto que la densidad óptica disminuye para la muestra solo con agua, acoplada con un cambio significativo de color.

10

Temperatura elevada

Las muestras se calentaron a 100 °C y 120 °C, respectivamente, durante un periodo de 24 horas.

15 Después de 8, 12, 18 y 24 horas, la estabilidad de las muestras se evaluó al medir el pH, el cambio de color (dE2000), el índice Gardener y la densidad óptica a 440 nm ($\lambda_{\text{máx.}}$). Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

	Tiempo	0	8 h		13 h		18 h		24 h	
	Temperatura [°C]	rt	100	120	100	120	100	120	100	120
(c) agua	pH	7.84	7.02	6.34	6.98	6.38	6.95	6.31	6.97	6.29
	dE2000	--	6.21	9.74	9.07	13.54	8.64	14.93	11.81	12.96
	Índice Gardener	13	13	12	12	12	12	12	12	12
	Densidad óptica	2.15	0.81	0.88	0.62	0.39	0.57	0.30	0.56	0.38

	Aspecto	claro	turbio	turbio	turbio	turbio	turbio, precipitado	turbio, precipitado	turbio, precipitado	turbio, precipitado
(d) betaina / glicerol / agua (35:40:25 p/p)	pH	8.17	6.96	6.64	6.58	6.65	6.64	6.69	6.75	6.66
	dE2000	--	8.79	4.91	5.35	8.88	4.58	5.62	5.00	8.92
	Índice Gardener	13	11	12	12	12	12	12	12	12
	Densidad óptica	1.98	1.14	0.86	0.99	0.51	0.88	0.56	0.72	0.47
	Aspecto	claro	claro	claro	claro	claro	claro	claro	claro	claro

De nuevo, las muestras en agua fueron menos estable que aquellas en el disolvente eutéctico consistente en betaina, glicerol y agua. En particular, las muestras en agua se volvieron turbias e incluso hubo formación de precipitado en puntos de evaluación tardíos. Para ambos disolventes, el color cambió visiblemente en el tiempo, pero el cambio fue más pronunciado para las muestras en agua.

Ejemplo 3: Conversión de Crocina a Crocetina por el microbioma de la piel (*in vitro*)

- 10 Se realizó un muestreo del microbioma de la piel en 7 voluntarios con una gasa estéril impregnada con NaCl en 5 áreas: frente, mejilla, nariz, cuello, antebrazo. Todas las muestras se combinaron para obtener una composición representativa de la microbiota de la piel.

- 15 El microbioma obtenido de este modo se cultivó en medio líquido (medio HT amortiguado) a 30 °C en presencia de crocina. Los sobrenadantes se recolectaron de forma regular y se analizaron con HPLC-MS para detectar crocina y crocetina.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tiempo	0 h	18 h	42 h	66 h	90 h	162 h	186 h	210 h
Concentración de crocina*	100%	100%	47.5%	2.9%	0.1%	--	--	--
Concentración de crocetina*	--	--	0.7%	7.9%	30.5%	65.3%	101.3%	101.3%

- 20 * % del máximo de concentración detectado

Como se puede observar de lo mencionado anteriormente, el microbioma presente en la superficie de la piel se convierte de crocina en crocetina en pocos días.

- 25 Ejemplo 4: Evaluación de la liberación de melatonina (*in vitro*)

La influencia de la luz azul en la liberación de melatonina se probó en un modelo de cultivo conjunto *in vitro* de neuronas sensoriales humanas y queratinocitos primarios.

5 Cultivo celular

Las neuronas sensoriales derivadas de células hiPS (células madre pluripotenciales inducidas humanas [por sus siglas en inglés]) mismas obtenidas de fibroblastos humanos. Las hiPS se sembraron en placas de 6 pozos recubiertas con una capa delgada de Matrigel® (Corning, ref.: 354277, lote: 72005017) a una densidad de 250,000 células por pozo en un medio de diferenciación consistente en DMEM-F12 (Panbiotech, ref.: P04-41450, lote: 2730618) complementado con 10% de suero reemplazo de inactivación (KSR, Life Technologies, ref.: 10828028, lote: 1896527), 0.1µM de ácido retinoico (Sigma, ref.: R4643, lote: SLBF3638V), un coctel de inhibidores de la vía de la diferenciación central y 1% de antibióticos Penicilina-Estreptomicina (PS, Panbiotech, ref.: P06-07100, lote: 7631018). Las células se mantuvieron durante 6 días en cultivo a 37 °C y 5 % de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 2 días.

Después de 6 días de cultivo, las células se disociaron usando Accutase (Sigma Aldrich ref.: A6964, lote: SLBT9789V) durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo al agregar medio de cultivo. La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm. La viabilidad celular se determinó por conteo celular con azul de tripano y las células se sembraron en placas de 24 pozos recubiertas con una capa delgada de Matrigel® a una densidad de 100,000 células por pozo en el mismo medio de diferenciación usado antes.

Después de 9 días de cultivo, el medio se reemplazó por un medio de maduración para neuronas sensoriales. Este medio de maduración estaba compuesto por DMEM-F12 complementado con 1 % de N2 (Life Technologies, ref.: 11520536, lote: 2004543), 10 ng/mL de BDNF (PanBiotech, ref.: CB-1115002, lote: 051861), 10 ng/mL de GDNF (PeproTech, ref.: 450-10, lote: H170806), 10 ng/mL de NT3 (PeproTech, ref.: 450-03, lote: H171010), 10 ng/mL de NGF (Sigma, ref.: N1408, lote: SLBW7063) y 1 % de antibióticos PS. Las células se mantuvieron en cultivo a 37 °C y 5 % de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 2 a 3 días.

Después de 14 días de cultivo, se agregaron queratinocitos a las placas encima de la capa de células hiPS diferenciadas.

Los queratinocitos, que fueron derivados de un explante de piel de un donador de 30 años, fueron amplificados previamente en medio de crecimiento de queratinocitos (Lonza, ref.: 192152, lote 723883) en un ciclo, antes de ser disociados por tripsinación y se congelaron. Estos queratinocitos se descongelaron, y se determinó la viabilidad celular por conteo celular. Los queratinocitos se sembraron a 30,000 células por pozo en un medio de cultivo consistente en 2/3 de medio para neuronas sensoriales y 1/3 de medio de crecimiento para queratinocitos. Las células se mantuvieron en cultivo a 37 °C y 5 % de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 2 a 3 días.

- Se desarrolló un protocolo basado en el uso de Glutamato y un aumento de temperatura (fase “día”). Además, se realizaron choques que contenían 50 % de FCS [por sus siglas en inglés] con el fin de sincronizar los ciclos celulares (Ramanathan *et al.*, Monitoring Cell-autonomous Circadian Clock Rhythms of Gene Expression Using Luciferase Bioluminescence Reporters, *Journal of Visualized Experiments*, 2012, 67: p.1-9; Buhr *et al.*, Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators, *Science*, 2010, 330(6002): 379–385; Balsalobre *et al.*, A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells, *Cell*, 1998, 93: 929–937).

A partir de este día, los cultivos celulares se colocaron 8 horas por día bajo condiciones que permitían una fase de día (glutamato 10 nM y una temperatura de 39.5 °C).

En el día 15 de cultivo conjunto, un medio rico en FCS (50 % de FCS y 50 % de medio 2/3 de medio de maduración para neuronas sensoriales y 1/3 de medio de crecimiento para queratinocitos) se incubó en presencia de las células durante las primeras 2 horas de la fase “día”. Este choque con FCS se aplicó a todas las células (se colocaron en alternación día/noche y controles sin alternar).

En el día 17 de cultivo conjunto, se aplicó otro choque de FCS a las células. El extracto del fruto de Gardenia (de Indfrag) se diluyó a 0.004% (p/v) en el medio de cultivo y se aplicó a las células durante la fase “día”. El mismo día, 30 minutos antes de la fase “noche”, las células de los cultivos conjuntos se expusieron a luz azul.

A partir de este día, se incubó 0.004 % (p/v) del extracto del fruto de Gardenia con cada cambio de medio de cultivo. El cultivo se mantuvo bajo las mismas condiciones y se trató con luz azul todos los días 30 minutos antes de la fase “noche”.

Para el análisis, se tomaron muestras de los sobrenadantes de cultivo 30 minutos antes de la fase “noche”, y 2 h, 5 h y 8 h después del cambio a la fase “noche” y se almacenó a -80 °C. Este procedimiento se realizó en los días 17, 18 (es decir, 24 h después del último choque con FCS), y 19 (es decir, 48 h después del último choque con FCS). Estas muestras de sobrenadante de cultivo se congelaron y se realizó un ensayo ELISA para medir la cantidad de melatonina liberada (BlueGene, ref. ABIN511419).

Después de 20 días de cultivo, las células se lavaron una vez con PBS y se realizó una prueba MTT para validar la viabilidad celular.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente por ANOVA de Kruskal-Wallis seguido por la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. La significancia de los resultados se señala como $p < 0.05$ con *, $p < 0.01$ con ** y $p < 0.001$ con ***.

Resultados

La Figura 1 muestra la liberación de melatonina en diferentes puntos temporales, con el eje x señalando el tiempo transcurrido después del último choque con FCS.

En el control sin tratar (“Sin tratar” en la Figura 1), la sincronización de las células indujo un ciclado de la liberación de melatonina después de 24 horas. La cantidad de melatonina aumento significativamente después de 2, 5 y 8 horas en comparación al nivel 30 minutos antes de la fase “día”.

En paralelo, se indujo estrés por luz azul a otro cultivo conjunto al final de cada fase “día” con el fin de reproducir la exposición a instrumentos digitales antes de dormir. Se determinó que esta condición (“Luz azul control” en la Figura 1) mostró una respuesta diferente: En el día 18, es decir, 24 h después del último choque con FCS, no hubo aumento en la liberación de melatonina. Esta diferencia es estadísticamente significativa. Estos resultados indican que el estrés por luz azul perturbó o retrasó el ciclo de la liberación de melatonina.

En las mismas condiciones de cultivo, un tercer cultivo conjunto se trató con extracto del fruto de Gardenia al 0.004% y luz azul (“Activo al 0.004%” en la Figura 1). Se determinó que este tratamiento

llevó a un ciclo de liberación de melatonina muy similar al del control sin tratar.

Los resultados de los estudios de liberación de melatonina se resumen en la siguiente tabla:

Tiempo (h)	Sin tratar		Luz azul control		Activo 0.004%	
	Promedio (pg/ml)	SEM	Promedio (pg/ml)	SEM	Promedio (pg/ml)	SEM
-0.5	10.60	0.0000	10.60	0.0000	10.60	0.0000
2	10.67	0.0333	10.70	0.0000	10.70	0.0577
5	10.67	0.0333	10.67	0.0667	10.63	0.0333
8	10.60	0.0000	10.67	0.0333	10.70	0.0000
23.5	10.70	0.0000	10.90	0.2082	10.63	0.0333
26	11.43	0.2603	10.43	0.1333	11.50	0.1155
29	11.80	0.1155	10.43	0.0882	11.80	0.2082
32	11.50	0.1000	10.47	0.0667	11.47	0.3180
47.5	10.57	0.3180	10.57	0.0333	10.93	0.0882
50	11.03	0.1856	10.53	0.1453	11.13	0.1202
53	10.80	0.1528	10.60	0.0577	11.33	0.0333
56	11.00	0.1732	10.87	0.0882	11.17	0.0333

- 5 Como se puede observar claramente, la condición sin tratar ("Sin tratar") y aquella tratada con extracto del fruto de Gardenia al 0.004% y luz azul (Activo al 0.004%) mostraron un aumento significativo a las 2, 5 y 8 horas después de la noche, es decir, después de la noche, es decir, 26, 29 y 32 horas después del último choque con FCS, respectivamente. En el segundo día después del tratamiento (día 19), hubo un aumento más pequeño, pero imperceptible, de melatonina.

10

Las muestras tratadas con luz azul, pero no con extracto ("Luz azul control") tuvieron una liberación de melatonina significativamente menor que las otras dos condiciones.

- 15 En conclusión, se determinó que el extracto del fruto de Gardenia al 0.004% es capaz de proteger las células contra los efectos de la exposición a la luz azul. En particular, permite conservar el nivel de liberación de melatonina, así como de su ciclo.

Ejemplo 5: Análisis de la red mitocondrial y propagación celular (*in vitro*) – Estudio 1

- 20 La red mitocondrial y la propagación celular son biomarcadores para envejecimiento celular.

Cultivo celular y tratamiento

Fibroblastos primarios dérmicos humanos de una donadora de 57 años fueron congelados y amplificados en matraces durante algunos días en medio de cultivo CnT-Prime dedicado a cultivo de células epiteliales (CellnTEC). A 24 h antes del inicio del ensayo, las células se dividieron en 3 grupos:

5

- Grupo 1 se dejó sin tratar;
- Grupo 2 se trató con 0.002 % (p/v) de extracto del fruto de Gardenia (de Yunnan rainbow; diluido en medio de cultivo); y
- Grupo 3 se trató con 0.004 % (p/v) de extracto del fruto de Gardenia (de Yunnan rainbow; diluido en medio de cultivo).

10

Después, las células se cargaron con tinte verde Mitotracker durante 15 minutos. Las células se lavaron con PBS, se desprendieron y se sembraron en una placa CYTOO con micropatrones en Y extra grandes a 2000 células/pozo en un medio de suero al 10 %.

15

El medio se reemplazó 1.5 h después, una vez que las células se unieron y propagaron en micropatrones, por un medio que contenía menos suero, además contenía las mismas concentraciones de extracto del fruto de Gardenia como se aplicó con anterioridad a cada uno de los grupos. Posteriormente, las células se incubaron durante 2 h a 37 °C con 5% CO₂.

20

Después de 2 h de tratamiento, las células se irradiaron con LEDS (referencia Kingbright KA-3529AQB25Z4S) a 447 nm durante 1 h a 20 J/cm² correspondiente a la dosis de 1 mes (28 días) de exposición a la pantalla a 10 cm de distancia.

25

Se agregó Hoechst durante 15 minutos en cada pozo para teñir el núcleo. El medio se renovó para lavar el Hoechst y las células se incubaron en medio de cultivo CnT-prime con el activo.

Obtención de imágenes

30

Se realizó la obtención de imágenes en vivo en el microscopio Leica. Al final de la obtención de imágenes, las células se fijaron y se tiñó la actina F con Phalloidin 555. Las imágenes se obtuvieron en la plataforma Operetta HCS de Perkin Elmer.

Análisis de la red

Una vez que se detectó la red mitocondrial, se calculó la suma de la longitud de todos los filamentos en una sola red celular con el fin de determinar la “longitud total de la red”, que se promedia entre todas las células individuales del mismo pozo. La red mitocondrial se puede dividir en grupos de filamentos que están enlazados continuamente: Esta unidad basal es llamada un “árbol”. El número de árboles por red, así como su longitud total se promediaron entre todas las células individuales detectadas en cada pozo.

Cada árbol se divide en “ramas” que se delimitan en cada extremo por una conexión o un punto terminal. Estas ramas se caracterizaron al medir su promedio y sus longitudes máximas en la red completa de cada célula individual (“longitud promedio de la rama”).

Análisis de propagación celular

Un análisis de imágenes dedicadas se corrió con el fin de detectar células individuales en micropatrones y para medir su área. Se contaron las células correctamente propagadas con un área mayor que 1800 μm^2 .

Análisis estadístico

Estos resultados se analizaron estadísticamente por ANOVA ordinaria con comparaciones múltiples. La significancia de los resultados se señala como $p < 0.05$ con *, $p < 0.01$ con ** y $p < 0.001$ con ***.

Resultados: Red mitocondrial

En la literatura, se ha descrito que la exposición a la luz azul puede llevar a una oxidación de las células y finalmente impactar la red mitocondrial (Rascalou *et al.*, Mitochondrial damage and cytoskeleton reorganization in human dermal fibroblasts exposed to artificial visible light similar to screen-emitted light, *Journal of Dermatological Science*, 2018, 91: 195–205). La mayor fragmentación de la red es la mayor perturbación de la célula.

En una primera parte del estudio, se analizó la red mitocondrial a través de un análisis de segmentación de red, cuyos resultados se muestran en la Figura 2. Se determinó que la condición sin tratar mostró una red de mitocondrias clara y definida (Figura 2a). Después de la exposición a la luz

azul, la red se volvió fragmentada y difusa como resultado del estrés oxidativo (Figura 2b). En presencia del extracto del fruto de Gardenia a 0.002%, la red parecía menos fragmentada (Figura 2c). Este efecto protector fue incluso más pronunciado en presencia del extracto del fruto de Gardenia a 0.004% (Figura 2d).

5

Esta red fue segmentada numéricamente para realizar un análisis cuantitativo. Se evaluaron diversos parámetros, incluyendo la longitud total de la red, el número de árboles, el número de ramas y sus longitudes promedio.

10 Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Sin tratar	Sin tratar + luz azul (20 J/cm ²)	Extracto del fruto de Gardenia a 0.002% + luz azul (20 J/cm ²)	Extracto del fruto de Gardenia a 0.004% + luz azul (20 J/cm ²)
Longitud total de la red	454.1 ± 21.1	259.7 ± 22.0	391.9 ± 22.0	450.4 ± 20.4
Número de árboles	0.127 ± 0.007	0.356 ± 0.015	0.223 ± 0.009	0.190 ± 0.006
Número de ramas	0.464 ± 0.005	0.678 ± 0.012	0.549 ± 0.010	0.533 ± 0.007
Longitud promedio del árbol	8.787 ± 0.438	2.788 ± 0.114	4.476 ± 0.136	5.397 ± 0.192
Longitud promedio de la rama	2.021 ± 0.025	1.334 ± 0.029	1.720 ± 0.037	1.747 ± 0.025

Como se puede observar de lo mencionado anteriormente, el estrés por luz azul llevó a una reducción significativa de la longitud total de la red mitocondrial. Este resultado confirmó los datos de la literatura. Sin embargo, en presencia del extracto del fruto de Gardenia se observó una protección significativa de la red en un +68% ($p < 0.001$) y +98% ($p < 0.001$), respectivamente.

15

La longitud total de la red se vincula automáticamente al número de árboles y de ramas: si se reduce la red, el número de árboles y de ramas aumenta y la longitud promedio de cada uno disminuye.

20 Como se esperaba, se determinó que el estrés por luz azul induce un aumento significativo del número de árboles y de ramas, y una disminución significativa del promedio de la longitud del árbol y de las ramas. Nuevamente, los extractos del fruto de Gardenia mostraron una protección significativa reduciendo el número de árboles en un 58% y 73% ($p < 0.001$), y el número de ramas en 60% y 68% ($p < 0.001$), respectivamente.

25

Resultados: Propagación celular

En la segunda parte del estudio, se analizó la propagación de las células y su área. Esta propagación está íntimamente ligada al estrés que sufren las células: cuando las células están estresadas, su citoplasma se retrae.

5

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Sin tratar	Sin tratar + luz azul (20 J/cm ²)	Extracto del fruto de Gardenia a 0.002% + luz azul (20 J/cm ²)	Extracto del fruto de Gardenia a 0.004% + luz azul (20 J/cm ²)
% de células propagadas	69.96 ± 1.83	52.10 ± 1.59	81.56 ± 1.20	78.77 ± 1.03
Área celular promedio	2089 ± 20.83	1887 ± 20.93	2257 ± 20.49	2239 ± 21.23

Se determinó que después de la exposición a la luz azul, el porcentaje de células propagadas disminuyó significativamente. Lo mismo aplica al área celular promedio. Sin embargo, en presencia del extracto del fruto de Gardenia se observó una protección significativa, aumentando el porcentaje de células propagadas en +165 % ($p < 0.001$) y en +149 % ($p < 0.001$) a 0.002 % y a 0.004 %, respectivamente. El área celular mejoró en +183 % y en +175 % a 0.002 % y 0.004 % del extracto, respectivamente ($p < 0.001$).

15 Ejemplo 6: Análisis de la red mitocondrial (*in vitro*) – Estudio 2

El análisis de la red mitocondrial descrito en el Ejemplo 5 se repitió para el extracto del fruto de Gardenia al 0.0015% en un disolvente eutéctico profundo natural consistente en 35 % en peso de betaína, 40 % en peso de glicerol, y 25 % en peso de agua (NaDES), en comparación con NaDES solo. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

20

	Sin tratar	Sin tratar + luz azul (20 J/cm ²)	Extracto del fruto de Gardenia a 0.0015 % en NaDES + luz azul (20 J/cm ²)	NaDES a 0.0015% + luz azul (20 J/cm ²)
Longitud total de la red	455.31 ± 19.62	243.29 ± 12.08	297.38 ± 19.15	198.88 ± 14.03
Número de árboles	0.15 ± 0.004	0.37 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.37 ± 0.02
Número de ramas	0.48 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.69 ± 0.01
Longitud	6.69 ± 0.25	2.70 ± 0.08	4.48 ± 0.46	2.80 ± 0.19

promedio del árbol				
Longitud promedio de la rama	1.92 ± 0.03	1.25 ± 0.02	1.49 ± 0.06	1.27 ± 0.04

Como se puede observar de lo mencionado anteriormente, el extracto del fruto de Gardenia en NaDES es capaz de proporcionar una protección significativa de la red: fue capaz de disminuir el número de árboles en -38% comparado con la condición sin tratar de estrés a la luz y de disminuir la longitud promedio del árbol en +66%. La misma tendencia se observó para los parámetros de las ramas: El extracto del fruto de Gardenia en NaDES fue capaz de reducir el número de ramas en -14 % y de aumentar la longitud promedio de las ramas en 19%.

El disolvente eutéctico profundo natural solo, por otro lado, no tuvo efecto protector contra el estrés por luz azul.

Ejemplo 7: Análisis de oxidación de proteínas (ex vivo)

La oxidación de proteínas es otro biomarcador del envejecimiento celular.

Cultivos y tratamientos

Se prepararon 12 explantes de piel humana de un promedio de 12 mm (± 1 mm) de diámetro en una plastia abdominal proveniente de una mujer caucásica de 35 años (referencia: P2159-AB35, fototipo III). Los explantes se mantuvieron en sobrevivencia en medio de cultivo BEM (Medio de explantes de BIO-EC) a 37 °C en una atmósfera húmeda, 5 %-CO₂.

Los explantes se asignaron a 4 grupos de la siguiente manera (3 explantes cada uno):

- Control sin tratar: explantes expuestos al ritmo de la luz
- Control de luz azul: explantes expuestos al ritmo de la luz y a estrés por luz azul
- Extracto del fruto de Gardenia (de Indfrag) al 0.002%: los explantes se expusieron al ritmo de la luz y al estrés por luz azul, con aplicación tópica del extracto del fruto de Gardenia al 0.002%
- Extracto del fruto de Gardenia al 0.004%: los explantes se expusieron a los ritmos de la luz y al estrés de la luz azul, con aplicación tópica del extracto del fruto de Gardenia al 0.004%

Los extractos del fruto de Gardenia se prepararon diluyendo el material comercial (Yunnan Rainbow) en solución salina amortiguada de fosfato (PBS [por sus siglas en inglés]) a las concentraciones respectivas (p/v).

5 Del día 0 al día 4 del estudio, los explantes de piel fueron expuestos a un ciclo de luz con el fin de imitar el ritmo circadiano, y las irradiaciones de luz azul, de acuerdo con el siguiente patrón:

- de 7 p.m. a 7 a.m. (12 horas): exposición de explantes a luz de día usando la lámpara SlimStyle W021/02 (Dayvia) que presenta un espectro de emisiones cercano a la radiación solar. Los explantes de piel se mantuvieron en medio de cultivo BEM durante la luz de día.
- de 7 a.m. a 10 a.m. (3 horas): exposición de los explantes a una dosis de 63.75 J/cm² de luz azul, en 1 mL de medio HBSS, usando el dispositivo Solarbox® (BioEC). Los explantes control sin tratar se mantuvieron en 1 ml de HBSS, en la oscuridad, durante todo el tiempo de la exposición a la luz azul. Al final de la exposición, todos los explantes se colocaron de regreso en 2 mL de medio BEM.
- de 10 a.m. a 7 p.m. (9 horas): los explantes se mantuvieron en la oscuridad en medio de cultivo BEM.

Para los últimos dos grupos, se aplicó extracto del fruto de Gardenia de forma tópica a 2 µl por explante (2 mg/cm²) y se distribuyó usando una espátula pequeña en los días 1, 2, 3 y 4 (antes de la exposición a la luz azul). Los explantes control no tratados no recibieron ningún tratamiento, excepto la renovación del medio de cultivo.

La mitad del medio de cultivo (1.2 ml por pozo) se renovó en los días 1, 2 y 3, al final de cada fase de oscuridad del ciclo de luz.

En el día 4, inmediatamente después de las últimas irradiaciones de luz azul, 3 explantes de cada condición se recolectaron y se cortaron en dos partes. Una parte se fijó en formalina amortiguada y la otra parte se congeló a -80 °C.

Inmunotinción de proteínas oxidadas

Las proteínas oxidadas se tiñeron en secciones congeladas después de una preincubación con DNPH (2,4-dinitrofenilhidracina, Millipore, ref. 90448) y una incubación con anticuerpo anti-DNP (Millipore,

ref. 90451) diluido a 1:250 en PBS, BSA 0.3% durante 1 h a 37 °C, con un sistema de amplificación de biotina/estreptavidina y revelado con VIP, un sustrato violeta de peroxidasa (Vector, ref. SK-4600).

La inmunotinción se realizó manualmente y se evaluó por observación microscópica.

5

Análisis de imagen: Cuantificación del índice de color

Las intensidades de tinción de las proteínas oxidadas se cuantificaron usando dos programas de software de obtención de imágenes ópticas de fuente abierta. Las fotomicrografías (formato jpeg) se abrieron en el Programa de Manipulación de Imagen GIMP-GNU. Las señales color intenso a rosa claro corresponden a que la tinción se seleccionó, copió y pegó en una nueva imagen y se guardó como un archivo jpeg, este archivo jpeg consistía únicamente de la tinción seleccionada. Esta imagen se abrió posteriormente usando el programa ImageJ. Se seleccionó un área dentro de la dermis para su análisis. Después, se creó un histograma de la sección, se separó el número total de píxeles en la imagen en categorías de 255 colores que abarcan el espectro visible. El pico correspondiente al color intenso a rosa claro se determinó al cortar y sumar los conteos adecuados de cada fotomicrografía. Alternativamente, los números correspondientes al pico se pueden pegar en una hoja de cálculo de Excel y sumarse.

El índice de pigmentación se dividió después por el área de superficie (expresada en unidades arbitrarias, A.U.[por sus siglas en inglés]).

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente por ANOVA de Kruskal-Wallis seguido por la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. La significancia de los resultados se señala como $p < 0.05$ con *, $p < 0.01$ con ** y $p < 0.001$ con ***.

Resultados

30

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Sin tratar	Sin tratar + luz azul (20 J/cm ²)	Extracto del fruto de Gardenia a 0.002% + luz azul (20 J/cm ²)	Extracto del fruto de Gardenia a 0.004% + luz azul (20 J/cm ²)
--	------------	---	--	--

Proteínas oxidadas (índice de color/superficie (A.U.))	0.010 ± 0.003	0.138 ± 0.042	0.026 ± 0.003	0.019 ± 0.007
--	---------------	---------------	---------------	---------------

Como se puede observar de lo mencionado anteriormente, la exposición a la luz azul llevó a un aumento significativo de proteínas oxidadas (+93%, $p < 0.01$). En presencia del extracto del fruto de Gardenia, por otro lado, se observó una clara protección de la luz azul, demostrada por una reducción de proteínas oxidadas en -81% ($p < 0.05$) y en -86% ($p < 0.01$) con el extracto a 0.002% y 0.004%, respectivamente.

Ejemplo 8: Estudios clínicos

10 *Formulación*

Para los estudios clínicos que se describen a continuación, se usó la formulación cosmética que tenía la fórmula INCI:

15 AGUA DE USO COSMÉTICO/AGUA, ALCOHOL CETÍLICO, ESTEARATO DE GLICERILO, ESTERATO DE PEG-75, CETEH-20, STEARETH-20, NEOPENTANOATO DE ISODECILO, EXTRACTO DE FRUTO DE GARDENIA, FENOXIETANOL, METIL PARABENO, PROPIL PARABENO, ETIL PARABENO, DIMETICONA, FRAGANCIA, SALICILATO DE BENCILO, LINALOOL, D-LIMONENO.

20

En la composición placebo, se omitió el extracto del fruto de Gardenia.

Con mayor detalle:

INCI	Activo	Placebo
AGUA DE USO COSMÉTICO/AGUA	89.698 % (p/v)	89.700 % (p/v)
ALCOHOL CETÍLICO, ESTEARATO DE GLICERILO, ESTERATO DE PEG-75, CETEH-20, STEARETH-20	5.0 % (p/v)	5.0 % (p/v)
NEOPENTANOATO DE ISODECILO	4.5 % (p/v)	4.5 % (p/v)
FENOXIETANOL, METIL PARABENO, PROPIL PARABENO, ETIL PARABENO	0.4 % (p/v)	0.4 % (p/v)
DIMETICONA	0.3 % (p/v)	0.3 % (p/v)
FRAGANCIA, LINALOOL, D-LIMONENO	0.1 % (p/v)	0.1 % (p/v)
EXTRACTO DEL FRUTO DE GARDENIA (de Indfrag)	0.002 % (p/v)	--

25 *Panel*

Los estudios clínicos se llevaron a cabo en 40 voluntarias, en edades entre 18 y 50 años con un promedio de edad de 35 ± 9 años. Los criterios de inclusión requerían que las voluntarias tuvieran arrugas en la cara y estar enfrente de una pantalla (dispositivos digitales) al menos 4 horas por día, de las cuales 2 horas consecutivas durante la tarde al 100% de la luminosidad de los dispositivos digitales. Las voluntarias fueron informadas de los posibles efectos adversos de usar el producto y de las condiciones técnicas, bajo las que se llevó a cabo la evaluación. Firmaron de manera voluntaria el formulario de consentimiento que fue escrito en cumplimiento con la Declaración de Helsinki y la ley Code de la Santé Publique del 20 de diciembre de 1988.

Durante el estudio, las voluntarias se aplicaron la crema facial que contenía 0.002% del extracto del fruto de Gardenia (de Indfrag) o un placebo dos veces al día (en la mañana y en la tarde) durante 56 días. Las propiedades antienvjecimiento del producto se analizaron por cuantificación del número de arrugas usando el análisis VISIA® (Canfield), y la calidad del ciclo de sueño se analizó mediante un registro diario.

Análisis del número de arrugas mediante VISIA®

Usando VISIA® (6a generación), se obtuvieron fotografías digitales del rostro en el D0, el D28, y el D56. El control de la reposición tuvo lugar directamente en la pantalla de procesamiento de datos, usando una visualización de superposición de las imágenes en cada momento de la obtención. VISIA® permite tomar fotografías con diferentes tipos de iluminación y una captura muy rápida de las imágenes. Una serie de fotos tomadas bajo obtención y análisis de imágenes multiespectrales permite capturar información visual que afecta la apariencia de la piel.

En este estudio, se analizaron las arrugas de patas de gallo.

Análisis de la calidad del sueño mediante registro diario

Las voluntarias llenaron un registro diario para recolectar datos en la fuente sobre la exposición a la luz azul, la duración de la exposición a la luz azul, estado de cansancio, facilidad para conciliar el sueño, número de despertares nocturnos, tipo de reacciones en la piel al producto y la intensidad de las reacciones en la piel.

Autoevaluación

La evaluación de la sensación percibida, la eficacia y la calidad cosmética del producto se realizó a través de un cuestionario en línea completado en Eval&Go (<https://www.evalandgo.com/>) por las voluntarias después de 27 y 55 días de la aplicación del producto durante el estudio.

Análisis estadístico

Primero, se verificó la ley Gaussiana por una prueba Shapiro-Wilk ($\alpha = 0.05$). Los datos sobre la reducción de arrugas no siguieron la ley Gaussiana; en consecuencia, se hizo un análisis estadístico no paramétrico. Para la comparación con el D0, se usó una prueba Wilcoxon no paramétrica (resultado significativo si $p < 0.05$). En relación con la comparación entre los dos productos (Activo y placebo), se realizó un análisis no apareado y no paramétrico con la prueba de Mann Whitney (resultado significativo si $p < 0.05$).

Para el análisis del cuestionario de autoevaluación y los resultados del registro diario, se hizo una prueba Chi cuadrada (análisis dicotómico que consiste en comparar el número de respuestas asociadas).

Resultados: Reducción del número de arrugas

Se determinó que el tratamiento con la crema facial que contenía 0.002% del extracto del fruto de Gardenia llevó a una reducción estadísticamente significativa del número de arrugas en el área de las patas de gallo en un -26 % en comparación con el D0.

Además, se demostró que también había una diferencia estadísticamente significativa entre la crema facial que contenía 0.002 % de extracto del fruto de Gardenia y el placebo de -21 % después de 56 días de aplicación. De hecho, la crema placebo no tuvo ningún efecto en las arrugas después de 56 días de aplicación.

Resultados: Mejora en el ciclo de sueño

Durante el estudio, el registro diario se usó para seguir el número de despertares durante la noche y en la facilidad de las voluntarias para conciliar el sueño.

Para este fin, el cuestionario contenía las siguientes tres preguntas, que las voluntarias tenían que contestar todos los días durante 56 días:

- 5 - ¿Se despertó durante la noche? -> Sí o NO
- ¿Cuántas veces se despertó?
- ¿Concilió fácilmente el sueño? -> Sí o NO

Después de 28 días de aplicación, se determinó que solo 31.1 % de las voluntarias que se aplicaban la crema facial que contenía 0.002 % del extracto del fruto de Gardenia se habían despertado durante la noche en al menos una ocasión, al mismo tiempo que 68.9% nunca se habían despertado durante la noche. Para el placebo, 49.5 % de las voluntarias se habían despertado durante la noche al menos en una ocasión, al mismo tiempo que solo el 50.5 % nunca se habían despertado durante la noche. Esta diferencia es estadísticamente significativa.

Después de 56 días de aplicación, se determinó que, del día 29 al día 56, solo 29 % de las voluntarias que se aplicaban la crema facial que contenía 0.002 % del extracto del fruto de Gardenia se habían despertado durante la noche en al menos una ocasión, al mismo tiempo que 71% nunca se habían despertado durante la noche. Para el placebo, 49.6 % de las voluntarias se habían despertado durante la noche al menos en una ocasión, al mismo tiempo que solo el 50.4 % nunca se habían despertado durante la noche. Esta diferencia nuevamente es estadísticamente significativa.

De este modo, se mostró que el extracto del fruto de Gardenia es capaz de reducir significativamente la frecuencia de los despertares durante la noche en comparación con el placebo.

La segunda pregunta permitió cuantificar el número de despertares nocturnos durante el periodo de estudio. Se determinó que las voluntarias que se aplicaban el placebo habían, en promedio, despertado 23 veces en los primeros 28 días y 41.1 veces en los 56 días totales. Por otro lado, las voluntarias que se aplicaron la crema facial que contenía 0.002 % del extracto del fruto de Gardenia solo se habían despertado 3 veces en los primeros 28 días y 7.5 veces en los 56 días totales, en promedio. De este modo, el extracto del fruto de Gardenia llevó a una reducción significativa en el número de despertares en -87 % y -82 % después de 28 y 56 días, respectivamente, en comparación con el placebo.

Estos resultados demostraron que el extracto del fruto de Gardenia es capaz de reducir el número de despertares durante la noche, de esa manera, mejorando la calidad de sueño.

Con la tercera pregunta, se evaluó la facilidad para conciliar el sueño. Usando el análisis dicotómico, se mostró que, en promedio, 90.6 % de las voluntarias que se aplicaban la crema facial que contenía 0.002 % del extracto del fruto de Gardenia conciliaron el sueño fácilmente, al mismo tiempo que solo el 84.8 % de las voluntarias que usaban el placebo afirmaron eso después de 1 mes de aplicación. Después de 2 meses, los porcentajes respectivos fueron 89.8 % y 85.8 %. Todas estas diferencias fueron nuevamente significativas.

Análisis de datos con base en la edad de las voluntarias

Los resultados fueron analizados adicionalmente con base en la edad de las voluntarias sometidas a prueba. Para este fin, se evaluó por separado un Grupo de menor edad (edades de 18-35) y un Grupo de más edad (edad de 35-50).

En relación con la reducción de arrugas, se determinó que el extracto del fruto de Gardenia (0.002 %) de la presente invención fue más efectivo para las voluntarias del Grupo de más edad que para aquellas del Grupo de menor edad: Para el Grupo de más edad, se observó una reducción significativa de -25 % en el número de arrugas después de 2 meses de aplicación. Este efecto fue significativo también en comparación con el placebo, que solo llevó a una reducción de -5%.

Para la frecuencia de despertares por noche (primera pregunta), los resultados se muestran en la siguiente tabla:

		Días 1-28		Días 29-56	
		Se despertó al menos una noche	No se despertó	Se despertó al menos una noche	No se despertó
Grupo de menor edad	Extracto del fruto de Gardenia	22%	78%	19%	81%
	Placebo	60%	40%	58%	42%
Grupo de más edad	Extracto del fruto de Gardenia	27%	63%	29%	61%
	Placebo	48%	52%	51%	49%

Como se puede observar de lo mencionado anteriormente, el extracto del fruto de Gardenia (0.002 %) de la presente invención llevó a un número significativamente menor de voluntarias del Grupo de

menor edad a despertarse durante la noche comparado con el placebo. El Grupo de más edad mostró la misma tendencia, pero con una eficiencia ligeramente menor.

- 5 Para el número promedio de despertares durante la noche (segunda pregunta) se observó una reducción significativa y drástica para el Grupo de menor edad, con una reducción de -83 % y -82 % en comparación con el placebo después de 28 y 56 días, respectivamente. Para el Grupo de más edad, se observó la misma tendencia; sin embargo, la diferencia entre el extracto del fruto de Gardenia y el placebo no fue significativa.
- 10 También, en relación con la facilidad para conciliar el sueño, se determinó que el extracto del fruto de Gardenia de la presente invención fue más eficiente para el Grupo de menor edad que para el Grupo de más edad.