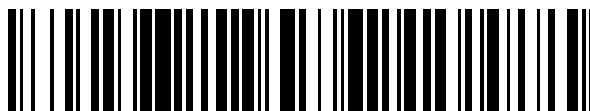


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 413**

51 Int. Cl.:

A61K 36/36 (2006.01)

B01D 11/00 (2006.01)

A23L 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07858214 .5**

96 Fecha de presentación: **28.12.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2124982**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **Composición que comprende un extracto de semillas de quinoa, utilización dermatológica**

30 Prioridad:

28.12.2006 FR 0656001

45 Fecha de publicación de la mención BOP:

21.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

21.12.2012

73 Titular/es:

**LABORATOIRES EXPANSCIENCE (100.0%)
10, AVENUE DE L'ARCHE
92400 COURBEVOIE, FR**

72 Inventor/es:

MSIKA, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 393 413 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende un extracto de semillas de quinoa, utilización dermatológica.

- 5 La invención se refiere a una composición cosmética, dermatológica o nutracéutica que comprende un excipiente apropiado y un extracto de semillas de quinoa.

10 La semilla de quinoa se clasifica entre los pseudo-cereales debido a consideraciones taxinómicas y a una composición química que la acerca a las gramíneas. Aunque su riqueza en proteínas y en varios minerales ha sido reconocida a partir de principios del siglo XX, su consumo se quedó limitado a la Cordillera de los Andes durante cerca de 6000 años. En el idioma Quechua de origen Inca, la palabra quinoa significa "chisiya mama" o "semilla madre" en español. En los siglos XVIII y XIX, los botánicos viajeros que atravesaron las regiones andinas hacían un gran elogio de ellas. Las tentativas de cultivos que hicieron en Europa fueron poco concluyentes. Un agrónomo alemán aseguró en 1917 haber logrado unos ensayos, pero éstos cayeron en el olvido. Debido a un interés

15 nutricional probado, a numerosas investigaciones realizadas estos últimos treinta años y a la curiosidad que provoca, la semilla de quinoa experimenta una creciente atracción. El nombre botánico de la quinoa es *Chenopodium quinoa* Willd. subsp. *quinoa*. Sus nombres usuales y vernáculos son:

- en quechua: quinua, kinua; (existen otros numerosos nombres locales en Sudamérica);
- 20 - en español: quinoa, quinua, arroz de Perú;
- en francés: quinoa, "petit riz", "riz du Pérou";
- en inglés: quinoa, quinua.

25 *Chenoponium quinoa* es una planta herbácea anual que mide de 0,5 a 2,1 metros de altura, según las condiciones medioambientales y el genotipo (plantas cultivadas de 1 a 1,5 metros). La raíz principal está densamente ramificada, lo cual facilita su resistencia a las heladas. La parte aérea aparece ramificada o no, según las variedades. Sus hojas, alternas, son bastante polimorfas (lanceoladas, deltoideas o triangulares). Son verdes cuando la planta es aún joven y después adquieren un color amarillo, rojo o púrpura en la madurez. La inflorescencia es de tipo panícula. Las flores apétalas son pequeñas y sésiles.

30 El fruto indehiscente es un aquenio. Contiene pequeñas semillas casi esféricas que miden de 1 a 2,0-2,6 mm de diámetro y cuyo aspecto recuerda al del mijo. Su color es blanco, amarillo, rojo, púrpura, marrón o negro. El pericarpio representa aproximadamente el 8% de la semilla, el embrión el 60-69%, y el perispermo aproximadamente el 23%.

35 Entre el género *Chenopodium*, dos especies salvajes, *C. hircinum* y *C. berlandieri*, son parecidas a *Chenopodium quinoa* (mismo número de cromosomas ($2n = 36$) e hibridaciones interespecíficas). Se han observado también unos casos de hibridaciones entre la quinoa y cenizo blanco (*Chenopodium album* L.).

40 Las quinoas cultivadas presentan importantes variabilidades de colores (plantas, inflorescencias, semillas), de contenidos en proteínas y en saponinas en las semillas, y de contenidos en beta-cianina y en oxalatos de calcio en las hojas.

45 La región andina, y más particularmente las orillas del lago Titicaca, resultan de una gran diversidad genética de población. Las principales variedades conocidas en esta región son las siguientes:

- en Perú: Kancolla, Cheweca, Witulla, Tahuaco, Camacani, Yocará, Wilacayuni, Blanca de Juli, Amarilla de Marangani, Pacus, Rosada, Blanca de Junin, Hualhuas, Huancayo, Mantaro, Huacariz, Huacataz, Acostambo, Blanca Ayacuchana y Nariño;
- 50 - en Bolivia: Sajama, Real Blanca, Chucapaca, Kamiri, Huaranga, Pasancalla, Pandela, Tupiza, Jachapucu, Wila Coymini, Kellu, Uthusaya, Chullpi, Kaslali y Chillpi;
- en Ecuador: Inbaya, Chaucha, INIAP-Cochasqui, Tanlahua, Piartal, Porotoc, Amarga del Chimborazo, Amarga de Imbabura y Morada;
- 55 - en Colombia: Dulce de Quitopampa;
- en Argentina: Blanca de Jujuy;
- 60 - en Chile: Baer, Lito, Faro y Picchaman.

Un botánico boliviano describió en 1968 17 tipos según sus caracteres morfológicos. Otros botánicos han propuesto cuatro eco-tipos principales definidos según su localización geográfica: el tipo "Valle", típico de 2000 a 4000 m de altitud; el tipo "Altiplano", típico de las tierras altas situadas por encima de 4000 m; el tipo "salado" situado alrededor de los 4000 m pero adaptado a los pH fuertes de los suelos de la región de Atacama; y los tipos "Nivel del mar"

encontrados en los valles interiores de Bolivia. La quinoa salvaje tiene como origen las altas mesetas de la Cordillera de los Andes. Se encuentra en Perú, en Bolivia y en el extremo norte de Chile, a unas altitudes que pueden superar los 3900 metros.

- 5 Las semillas secas de quinoa están compuestas por agua (aproximadamente el 10%, valor del 12,6% mencionado en la bibliografía), por materias minerales (valores del 2,46 al 3,4% mencionados en la bibliografía), por glúcidos (valores del 58,5% y del 61,2% mencionados en la bibliografía para las semillas crudas, y del 62,8% para las semillas pulidas), por proteínas (valores del 12,2 al 13,8% mencionados en la bibliografía, del 14,8 y del 15,7% para quinoas dulces y amargas respectivamente), por lípidos (valores que varían de aproximadamente el 4,5 al
- 10 aproximadamente 10% mencionados en la bibliografía), por saponósidos y por polifenoles. Los porcentajes indicados están expresados en peso con respecto al peso total de la semilla seca.

Como glúcidos, la semilla seca de quinoa comprende unas fibras alimenticias (valores del 6,6% mencionados en la bibliografía), unas fibras crudas (valor del 2,2% mencionado en la bibliografía) incluyendo unas fibras solubles en agua (1,26 g/100 g según la bibliografía) y unas fibras insolubles en agua (5,38 g/100 g según la bibliografía). La glucosa (4,5% según la bibliografía), la fructosa (2,4% según la bibliografía) y la sacarosa (2,4% según la bibliografía) son importantes. Los porcentajes indicados se expresan en peso con respecto al contenido total en peso de glúcidos en la semilla seca.

20 Como lípidos, la semilla seca de quinoa comprende unos ácidos grasos, unos fosfátidos (lisofosfatidiletanolamina principalmente), unos tocoferoles (α -tocoferol y γ -tocoferol principalmente), unos hidrocarburos (escualeno) y unos esteroides.

25 Los ácidos grasos mayoritarios son el ácido linoleico y el ácido oleico. La semilla seca contiene también unas cantidades significativas de ácido palmítico y de ácido α -linolénico. Puede contener también ácido mirístico, ácido 5-hexadecenoico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido eicosanoico, ácido behénico, ácido 9-docosenoico, ácido tetracosenoico u otros ácidos. Las semillas crudas y las semillas pulidas y lavadas tienen unas proporciones en ácidos grasos muy parecidas.

30 En la bibliografía, se mencionan unos porcentajes elevados de ácidos grasos libres: 18,9% en la semilla entera; un índice de yodo de 129; un índice de saponificación de 190, un contenido en materia insaponificable del 5,2%.

Según la bibliografía, los esteroides mayoritarios son el Δ^7 -estigmasterol. Los demás esteroides que pueden estar presentes son el $\Delta^5,24$ (28)-avenasterol, el β -sitosterol, el Δ^7 -campesterol, el estigmasterol, el colesterol, el campesterol, el fucostanol, el 24-etilen- Δ^7 -colesteno-3 β -ol.

Los saponósidos presentes en la semilla de Quinoa han sido ampliamente estudiados desde hace 25 años por investigadores de diferentes continentes. Se trata de saponósidos triterpénicos. Estos constituyentes están esencialmente situados al nivel del pericarpio de la semilla.

40 Las aplicaciones de la quinoa, y de sus extractos, con la excepción de las saponinas, se han limitado hasta ahora al campo alimenticio. A título de ejemplo, se puede citar la solicitud internacional WO 2005/058249 que describe un concentrado de proteínas utilizado en los productos alimenticios.

45 La solicitud internacional WO 2006/053415 da a conocer unas utilidades dermatológicas de numerosos extractos de plantas incluyendo la quinoa. Los extractos de quinoa se obtienen mediante extracción acuosa o etanólica sobre plantas estresadas y no estresadas. El extracto acuoso así obtenido contiene algunas proteínas hidrosolubles, unos taninos, unos azúcares libres y unos oligosacáridos, unos heterósidos (saponinas + flavónicas). El extracto etanólico contiene, por su parte, unas saponinas, unos polifenoles, unos lípidos triterpénicos y algunos lípidos. Sin embargo,

50 los ensayos realizados sobre la interleucina IL-8 muestran que el extracto ensayado induce la síntesis de esta interleucina IL-8 y se debe concluir por lo tanto que este extracto es pro-inflamatorio. Así, de hecho, no se recomienda para una utilización dermatológica. Por lo tanto, hasta ahora no se ha considerado ninguna utilización dermatológica sería de la quinoa y de sus extractos.

55 Ahora bien, los inventores han descubierto, de manera sorprendente, que algunos extractos de quinoa no son inflamatorios y presentan unas propiedades cosméticas, dermatológicas o nutracéuticas interesantes.

Se da a conocer en la presente memoria una composición cosmética, dermatológica o nutracéutica que comprende un extracto de semillas de quinoa y, llegado el caso, un excipiente apropiado, caracterizada porque dicho extracto es un extracto peptídico o un extracto lipídico de semillas de quinoa. La composición nutracéutica puede no comprender ningún excipiente.

La figura 1 identifica las diferentes etapas de obtención de los diversos extractos lipídicos y peptídicos. A partir de semillas de quinoa (A), el procedimiento comprende una primera etapa (1) de extracción por presión, por disolvente, a presión supercrítica. De este extracto, se valoriza o bien la parte lipídica (aceite crudo B) o bien la parte peptídica

(torta V). El aceite crudo se somete a un refinado (2) para dar un aceite refinado (C). Este aceite refinado (C) se somete a una destilación molecular (3) para dar un aceite concentrado en su fracción insaponificable (o concentrado; D). Este aceite concentrado (D) se somete después a una saponificación y extracción (4) para dar los insaponificables (E). En lo que se refiere a la parte proteica, la torta (V) se lava con agua y/o etanol (11) con el fin de suprimir las saponinas, azúcares solubles, heterósidos y polifenoles (Z). La torta lavada se somete después a una etapa de solubilización de las proteínas a pH alcalino (12). A título alternativo, el procedimiento puede comprender una etapa suplementaria de tratamiento enzimático α -amilasas/celulasas (20). El procedimiento comprende después una etapa de centrifugación y después, de ultrafiltración (13), lo cual permite la eliminación de los insolubles (Z') y da las proteínas concentradas (W). Estas proteínas concentradas (W) son sometidas después a una etapa de tratamiento enzimático por proteasas (14) y después a tratamiento térmico, ultrafiltración y nanofiltración (15), lo cual da los péptidos (X) (+ azúcares Y).

La presente invención tiene en primer lugar por objeto una composición cosmética, dermatológica o nutracéutica que comprende un extracto lipídico de semillas de quinoa y, llegado el caso, un excipiente apropiado, siendo dicho extracto lipídico un insaponificable.

Los aceites de semillas de quinoa pueden ser extraídos mediante varios procedimientos:

- extracción física, tal como la presión en frío sobre prensa mecánica, la presión sobre extrusora de doble tornillo;
- extracción química con la ayuda de disolventes orgánicos (alcanos alifáticos, alcoholes, disolventes clorados, disolventes fluorados);
- extracción en medio supercrítico, con la ayuda del dióxido de carbono solo y/o con unos co-disolventes.

Antes de la extracción del aceite, las saponinas, contenidas mayoritariamente en la pared externa de las semillas, son ventajosamente eliminadas previamente mediante descascarillado abrasivo o por lavado con agua. Por otra parte, las semillas pueden ser tratadas previamente hidrotérmicamente.

Para la extracción de aceite crudo de quinoa, se preferirá la utilización de un disolvente químico de tipo alcano alifático tal como el n-hexano. Según un modo de extracción particular, las semillas, descascarilladas y lavadas, eventualmente pretratadas hidrotérmicamente, son aplastadas, con el fin de obtener unos copos, antes de ser introducidas en un extractor continuo de cinta, y los lípidos son extraídos por percolación de n-hexano. La miscela recogida se evapora al vacío con el fin de recuperar el aceite sin disolventes.

Las especificaciones del aceite crudo de quinoa se proporcionan en la tabla I siguiente:

Corte graso (% en peso con respecto al peso total del aceite)	
C14 (ácido mirístico)	≤ 1,0
C16 (ácido palmítico)	5,0 - 12,0
C16' (ácido 5-hexadecenoico)	≤ 1,0
C18 (ácido esteárico)	≤ 2,0
C18' (ácido oleico)	20,0 - 35,0
C18'' (ácido linoleico)	40,0 - 60,0
C18''' (ácido α -linolénico)	2,0 - 13,0
C20 (ácido araquídico)	≤ 1,0
C20' (ácido eicosanoico)	≤ 3,0
C22 (ácido behénico)	≤ 1,0
C22' (ácido 9-docosenoico)	≤ 3,0
C24 (ácido tetracosenoico)	≤ 1,0
Contenido en tocoferoles (mg/100 g)	4 - 300
Contenido en esteroides (g/100 g)	1,0 - 3,0
Contenido en escualeno (g/100 g)	1,0 - 5,0
Contenido en insaponificable (g/100 g)	3,0 - 8,0

Tabla I: especificaciones de aceite de quinoa crudo

Este aceite es alimenticio. Por eso, puede ser consumido por el ser humano. Respeta por lo tanto las normas CODEX. No contiene o contiene muy pocos ácidos grasos libres. Según las normas en vigor, los valores máximos de índice de ácido son de 0,4 mg KOH/g de aceite, para los aceites obtenidos por presión en frío y los aceites vírgenes. No contiene sub-productos de oxidación o productos residuales de tipo residuos fitosanitarios y HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos).

El aceite crudo de quinoa puede ser refinado según unos procedimientos conocidos por el experto en la materia,

tales como el refinado físico (desgomado con agua, desacidificación por desodorización a alta temperatura) y el refinado químico (desmucilagínación con agua o tratamiento ácido con el fin de eliminar los fosfolípidos, neutralización de los ácidos grasos libres con la ayuda de una disolución básica, decoloración, frigelización y desodorización). Se preferirá el refinado químico ya que permite eliminar las saponinas arrastradas durante la extracción, así como la fuerte proporción de fosfolípidos y de ácidos grasos libres.

Las especificaciones del aceite de quinoa refinado se proporcionan en la tabla 2 siguiente:

Corte graso (% en peso con respecto al peso total del aceite)	
C14	≤ 1,0
C16	5,0 - 12,0
C16'	≤ 1,0
C18	≤ 2,0
C18'	20,0 - 35,0
C18''	40,0 - 60,0
C18'''	2,0 - 13,0
C20	≤ 1,0
C20'	≤ 3,0
C22	≤ 1,0
C22'	≤ 3,0
C24	≤ 1,0
Contenido en tocoferoles (mg/100 g)	4 - 200
Contenido en esteroides (g/100 g)	0,5 - 3,0
Contenido en escualeno (g/100 g)	0,5 - 3,0
Contenido en insaponificable (g/100 g)	2,0 - 6,0

Tabla 2: especificaciones de aceite de quinoa refinado

Este aceite es alimenticio. Por lo tanto, puede ser consumido por el ser humano. Respeta por lo tanto las normas CODEX. No contiene o contiene muy pocos ácidos grasos libres. Según las normas en vigor, los valores máximos de índice de ácido son de 0,6 mg KOH/g de aceite, para los aceites refinados. No contiene sub-productos de oxidación o productos residuales de tipo residuos fitosanitarios y HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos). Presenta también unos triglicéridos cuya distribución en ácidos grasos es idéntica al aceite de partida, lo cual le permite beneficiarse de la denominación de aceite vegetal natural.

Se da a conocer asimismo un procedimiento de preparación de un aceite refinado de quinoa que tiene unas especificaciones definidas en la tabla 2, que comprende una etapa de refinado químico del aceite crudo de quinoa. Según una variante ventajosa, el procedimiento comprende las etapas descritas anteriormente.

El aceite refinado de quinoa obtenido anteriormente puede ser concentrado en su fracción insaponificable mediante un procedimiento de destilación molecular.

El insaponificable es la fracción de un cuerpo graso que, después de una acción prolongada de una base alcalina, sigue insoluble en agua y puede ser extraída mediante un disolvente orgánico. Cinco grandes grupos de sustancias están presentes en la mayoría de los insaponificables de aceites vegetales: hidrocarburos saturados o insaturados, alcoholes alifáticos o terpénicos, esteroides, tocoferoles, los pigmentos carotenoides y xantófilos.

Esta etapa de destilación molecular se realiza preferentemente utilizando un dispositivo seleccionado de entre los destiladores moleculares de tipo centrífugo y los dispositivos moleculares de tipo con película raspada.

Los destiladores moleculares de tipo centrífugo son conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, la solicitud EP 493 144 describe un destilador molecular de este tipo. De manera general, el producto a destilar se extiende en una capa delgada sobre la superficie calentada (superficie caliente) de un rotor cónico que gira a gran velocidad. El recinto de destilación se coloca al vacío. En estas condiciones, aparece una evaporación y no una ebullición, desde la superficie caliente, de los constituyentes del aceite tales como los insaponificables, teniendo la ventaja de que el aceite y sus constituyentes, en particular los insaponificables (siendo estos productos considerados frágiles), no son degradados durante la evaporación.

Los destiladores moleculares de tipo con película raspada son también conocidos por el experto en la materia. De manera general, comprenden una cámara de destilación dotada de un raspador giratorio, que permite la extensión en continuo sobre la superficie de evaporación (superficie caliente) de los productos a destilar. Los vapores de producto se condensan por medio de un dedo refrigerado, colocado en el centro de la cámara de destilación. Los sistemas periféricos de alimentación y de vaciado son muy parecidos a los de un destilador centrífugo (bombas de alimentación, bombas de vacío de paletas y de difusión de aceite, etc.). La recuperación de los residuos y de los destilados en unos matraces de vidrio se realiza mediante flujo gravitacional.

Al final de la etapa de fraccionamiento, la fracción destilada rica en insaponificables representa ventajosamente del 5 al 15% en peso del aceite de partida, y la fracción destilada rica en triglicéridos representa ventajosamente del 85 al 95% en peso del aceite de partida. Además, se ha verificado que este procedimiento no conlleva ninguna modificación química o alteración de los compuestos del insaponificable, y que se conservaban las fracciones muy insaturadas. En consecuencia, la distribución en ácidos grasos del aceite de quinoa concentrado es idéntica a la del aceite de quinoa antes de la concentración.

El aceite de quinoa concentrado en su fracción insaponificable presenta las especificaciones dadas en la tabla 3 siguiente:

Corte graso (% en peso con respecto al peso total del aceite)	
C14	≤1,0
C16	5,0 - 15,0
C16*	≤ 1,0
C18	≤ 2,0
C18'	20,0 - 35,0
C18''	40,0 - 60,0
C18'''	2,0 - 13,0
C20	≤ 1,0
C20'	≤ 3,0
C22	≤ 1,0
C22'	≤ 3,0
C24	≤ 1,0
Contenido en tocoferoles (mg/100 g)	40 - 5000
Contenido en esteroides (g/100 g)	3,0 - 20,0
Contenido en escualeno (g/100 g)	2,0 - 40,0
Contenido en insaponificable (g/100 g)	5,0 - 50,0

Tabla 3: especificaciones de aceite de quinoa refinado concentrado en su fracción insaponificable

Este aceite refinado en su fracción insaponificable es a su vez un nuevo alimento, dado a conocer en la presente memoria. Por lo tanto, puede ser consumido por el ser humano. Respeta por lo tanto las normas CODEX. No contiene o contiene muy pocos ácidos grasos libres. En el ámbito de un nuevo procedimiento de aprobación para un nuevo producto alimenticio ("novel food") ante las instancias competentes, se definirán unos valores máximos de índice de ácido.

Además, no contiene sub-productos de oxidación o productos residuales de tipo residuos fitosanitarios y HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos). Presenta también unos triglicéridos cuya distribución en ácidos grasos es idéntica al aceite de partida, lo cual le permite beneficiarse de la denominación aceite vegetal natural.

Estando este aceite refinado enriquecido en su fracción insaponificable, permite aportar al organismo, para un mismo aporte en triglicéridos que un aceite refinado, unas cantidades más importantes de elementos nutritivos, tales como unos fitosteroides y unas vitaminas, sin aporte calórico suplementario.

Se da a conocer asimismo un procedimiento de preparación de un aceite de quinoa concentrado en su fracción insaponificable, que comprende una etapa de destilación molecular de un aceite refinado de quinoa. En particular, la etapa de destilación molecular se realiza utilizando un dispositivo seleccionado de entre los destiladores moleculares de tipo centrífugo y los dispositivos moleculares de tipo película raspada. El procedimiento comprende ventajosamente las etapas descritas anteriormente.

El insaponificable de aceite de quinoa se puede obtener mediante unos procedimientos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede obtener efectuando una saponificación sobre el aceite de quinoa concentrado en su fracción insaponificable, y después extrayendo este insaponificable con la ayuda de un disolvente apropiado. Este extracto se lava después hasta la eliminación completa de los jabones y después el disolvente se evapora. Por último, el insaponificable sufre ventajosamente una desodorización con vapor de agua y después una purga con nitrógeno con el fin de eliminar las trazas de disolvente.

El insaponificable de aceite de quinoa presenta ventajosamente las especificaciones dadas en la tabla 4 siguiente:

Contenido en tocoferoles (g/100 g)	1,5 - 3,5
Contenido en esteroides (g/100 g)	20,0 - 50,0
Contenido en escualeno (g/100 g)	20,0 - 50,0

Tabla 4: especificaciones de un insaponificable de aceite de quinoa

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de un insaponificable de quinoa, que comprende una etapa de saponificación de un aceite de quinoa concentrado en su fracción insaponificable, y después una extracción de este insaponificable con la ayuda de un disolvente apropiado. El procedimiento comprende ventajosamente las etapas descritas anteriormente.

La presente invención tiene asimismo por objeto una composición tal como se ha definido anteriormente, que comprende un extracto lipídico de semillas de quinoa que se selecciona a su vez de entre el grupo constituido por un aceite concentrado en su fracción insaponificable, un insaponificable o un aceite refinado que tiene las especificaciones dadas anteriormente (tabla 2), para su utilización en la prevención y el tratamiento de las reacciones o patologías alérgicas, inflamatorias, irritativas de la piel y/o de las mucosas y/o de los faneros inmaduros, normales o maduros.

Se da a conocer asimismo en la presente memoria un extracto peptídico y osídico de semillas de quinoa.

El extracto peptídico y osídico se obtiene ventajosamente mediante un procedimiento que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- a) a partir de semillas de quinoa, extraer un aceite crudo y una torta, y recuperar dicha torta;
- b) lavar dicha torta mediante agua o una mezcla hidroalcohólica para conservar sólo la parte proteica, y después
- c) solubilizar las proteínas;
- d) concentrar las proteínas y después hidrolizar dichas proteínas en péptidos;
- e) purificar y recuperar el extracto peptídico.

El extracto peptídico y osídico según la invención presenta ventajosamente las especificaciones siguientes:

% en peso con respecto al peso total del extracto peptídico	
Contenido en péptidos (%)	25 - 90
Contenido en azúcares totales (%)	10 - 50

Tabla 5: especificaciones de un extracto peptídico de quinoa

Se da a conocer asimismo en la presente memoria un procedimiento de preparación de un extracto peptídico y osídico de quinoa, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- a) a partir de semillas de quinoa, extraer un aceite crudo y una torta, y recuperar dicha torta;
- b) lavar dicha torta mediante agua o una mezcla hidroalcohólica para conservar sólo la parte proteica, y después
- c) solubilizar las proteínas;
- d) concentrar las proteínas y después hidrolizar dichas proteínas en péptidos;
- e) purificar y recuperar el extracto peptídico.

Por otra parte, previamente a la concentración de las proteínas (etapa d)), las fibras son ventajosamente eliminadas.

Se describe a continuación un modo de realización preferido de obtención del extracto peptídico y osídico.

La torta de semillas de quinoa obtenida después de la eliminación de disolventes, durante la extracción de los lípidos, se dispersa en agua o en una mezcla de etanol/agua con el fin de extraer y eliminar los saponósidos, los heterósidos y los polifenoles. Esta mezcla se escurre o se centrifuga con el fin de recuperar el residuo, y se aparta el zumo. El residuo se dispersa y se mezcla en agua, a un pH alcalino comprendido entre 8 y 13, con el fin de solubilizar las proteínas. Es posible o bien eliminar las fibras mediante una nueva centrifugación, o bien practicar una hidrólisis del almidón y de las fibras (celulosa, hemicelulosa, etc.) con la ayuda de un mezclador de α -amilasas y de celulasas.

Las proteínas solubles se concentran entonces o bien mediante precipitación en medio ácido al punto isoelectrico, o bien mediante ultrafiltración. Las proteínas concentradas son hidrolizadas después por unas enzimas, ventajosamente unas proteasas alcalinas. Un tratamiento térmico permite desnaturalizar las enzimas al final de la reacción.

El medio de reacción sufre una ultrafiltración sobre una membrana que tiene un límite de corte de 10 kDa con el fin de eliminar las proteínas residuales (retentado). El filtrado se concentra después al porcentaje de materia seca deseado y se desala por nanofiltración con una membrana de límite de corte de 200 Da. Por último, el producto se envasa después de ser filtrado estérilmente (0,2 μ m).

La composición puede comprender además por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por

- unos activos utilizados clásicamente en dermatología tales como los emolientes, los activos hidratantes, los activadores de la síntesis de queratina, los queratorreguladores, los queratolíticos, los agentes reestructurantes de la barrera cutánea (activadores de la síntesis de los lípidos cutáneos, unos agonistas PPAR o Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisoma), los agonistas RXR o LXR, los SERM, los agonistas de los receptores de la vitamina D o de los corticoides, los activadores de la diferenciación de los queratinocitos (retinoides, Calcitriol[®], el calcio), los sebo-reguladores (los inhibidores de 5- α -reductasa, en particular el activo 5- α . Avociata[®] comercializado por los laboratorios Expanscience), los conservantes, los agentes anti-irritantes, los agentes calmantes, los filtros y protectores solares, los agentes antioxidantes,
- unos principios activos que tienen una acción terapéutica complementaria, tales como los antibióticos, los pre y probióticos, los agentes antibacterianos, los compuestos antifúngicos, los agente antivíricos, los inmunomoduladores (tacrolimus o pimecrolimus), las oxazolininas, los factores de crecimiento, los agentes cicatrizantes o las moléculas eutróficas, los medicamentos, los agentes anti-inflamatorios, los agentes pigmentantes o hipopigmentantes, los agentes lipolíticos o inhibidores de la lipogénesis, los filtros y protectores solares minerales u orgánicos pigmentarios o ultrafinos, unos alimentos clásicos o funcionales: hiper o hipoglicemiantes, unos nutrientes antigrasa o anticelulitis, antiolesterol, antioxidante, energizantes, reconstituyentes, que tienen un impacto sobre los síntomas secundarios de la menopausia,
- unos extractos naturales de planta (partes de vegetales extraíbles en fase acuosa u oleosa: polifenoles, flavonoides, otros péptidos y azúcares, etc.), unos compuestos que contienen unos insaponificables de aceites vegetales, unos insaponificables esterólicos o unos productos que pueden contenerlos (insaponificables de aceites vegetales, en particular insaponificables de aceite de soja, insaponificables de mantecas vegetales o de materias butirosas y sus mezclas, insaponificables de ceras naturales, insaponificables de extractos oleosos, insaponificables de coproductos oleosos industriales, insaponificables de extractos de cuerpos grasos de origen animal, insaponificables de aceites marinos, insaponificables de extractos de la materia grasa láctica, insaponificables de lípidos extraídos de organismos unicelulares, insaponificables de lípidos extraídos de algas y organismos marinos, etc.), unos esteroides, unos estanoles, unos fitoesteroides, unos fitoesteroides, unos tocoferoles, unos concentrados de aceites de girasol, de colza y/o de palma, unos oligoelementos, unas vitaminas, unos ácidos grasos con omega 3, 6 ó 9, unas plantas hipoglicemiantes o hiperglicemiantes o endulzantes.

Los activadores de la síntesis de queratina que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente los retinoides, los péptidos de altramuz comercializados por la compañía Silab, unas proteínas claves del estrato córneo o granuloso (queratinas) y de los corneodesmosomas.

Los agentes calmantes que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente el alfa-bisabolol, los derivados de regaliz, el ibuprofeno, la enoxolona. Los queratorreguladores que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente los alfa-hidroxiácidos y sus derivados. Un queratolítico que se puede utilizar en asociación es en particular el ácido salicílico y sus derivados.

Los factores de crecimiento que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente la becaplermina y la TGF-beta (Transforming Growth Factor beta), el EGF, el NGF, el VEGF.

Los antioxidantes que se pueden utilizar en asociación se seleccionan ventajosamente de entre el grupo constituido por los oligoelementos (cobre, zinc, selenio), el ácido lipoico, solo o asociado a la vitamina B12, las vitaminas C, las vitaminas E, los flavonoides (té verde, etc.), el beta-caroteno, el licopeno o la luteína, las sustancias antiglicación tales como la carnosina, la n-acetil-cisteína, las isoflavonas de soja, las proteínas de soja, así como las enzimas antioxidantes o radicalarias SOD (super oxyde dismutase) catalasa, glutatión peroxidasa, tioredoxina reductasa y sus agonistas.

Los agentes que reestructuran la barrera cutánea, que permiten estimular la síntesis de los lípidos claves de la epidermis, y que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente unos concentrados de girasol, más ventajosamente unos concentrados de girasol linoleicos, tales como el activo comercializado por los laboratorios Expanscience, Soline[®] (véase la solicitud internacional WO 01/21150), unos insaponificables de aceite vegetal, tal como el Avocadofurane[®] (véase la solicitud internacional WO 01/21150), unos agonistas PPAR (rosiglitazona, pioglitazona), RXR, LXR.

Los compuestos antifúngicos que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente el econazol y el ketoconazol.

Los conservantes antisépticos que se pueden utilizar en asociación, son por ejemplo, el triclosano, la clorhexidina, los amonios cuaternarios.

Los antibióticos que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente el ácido fúcido, la penicilina, las tetraciclinas, la pristinamicina, la eritromicina, la clindamicina, la mupirocina, la minociclina, la doxiciclina. Los agentes antivirales que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente el aciclovir y el valaciclovir. Los

agentes anti-irritantes que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente la glicina, los azúcares y/o péptidos de altramuza, la Cyclocéramide® (derivado de oxazolina).

Los agentes cicatrizantes que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente la vitamina A, el pantenol, el Avocadofurane®, el óxido zinc, el magnesio, el silicio, el ácido madecásico o asiático, el sulfato de dextrano, la glucosamina, la condroitina sulfato y globalmente los GAG, los péptidos de soja fermentada o no, los oligoelementos.

Los medicamentos que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente los medicamentos apropiados para una administración por vía tópica u oral, para la prevención y/o el tratamiento de la atopía (corticoides, inmunomoduladores tópicos inhibidores de la calcineurina, emolientes), del acné (antibióticos, peróxido de benzoílo, retinoides, ácido azelaico, vitamina PP, vitamina B3, zinc, ciclinas), del eczema (inmunomoduladores, emolientes, aceite de salmón, de borraja, los prebióticos) o de la psoriasis (corticoides, calcipotriol, calcitriol, tazaroteno, aceite de enebro, acitretina, terapia PUVA) o de los medicamentos (o alimentos) hiperlipemiantes y/o de los medicamentos (o alimentos) hipolipemiantes. Entre estos dos últimos tipos de medicamentos, es posible citar los medicamentos a base de sulfonilureas y glinidas, los medicamentos a base de inhibidores de alfa-glucosidasas, los medicamentos a base de biguanidas (metformina), los medicamentos a base de activadores de la sensibilidad a la insulina o tiazolidinodionas (TZD, pioglitazona, rosiglitazona), que son unos agonistas PPAR, los medicamentos hipolipemiantes de la familia de las estatinas o de la familia de los fibratos (agonistas de PPARα), el orlistat (Xenical) y la sibutramina (Réductyl o Sibutral).

Los nutrientes antigrasa que se pueden utilizar en asociación se seleccionan ventajosamente de entre el grupo constituido por unos nutrientes bloqueadores de la adsorción de las grasas, tales como el quitosano, unos nutrientes capaces de aumentar la termogénesis ("quemador de grasa") tales como la efedrina (hierba china Ma Huang), la cafeína, la teína y el *citrus aurantium*, unos nutrientes capaces de regular el apetito (supresor de apetito) tales como la L-fenilalanina y la L-tirosina, unos nutrientes capaces de regular la glicemia, tales como unos minerales, por ejemplo el cromo o el vanadio o el magnesio, o la hierba ayurvédica *Gymnema sylvestre*, unos inhibidores de la lipogénesis, tales como el ácido hidroxícitrónico extraído del *Garcinia cambodgia* y unos nutrientes capaces de transportar unas grasas tales como la L-carnitina.

Unos ejemplos de alimentos o de terapias hiperglicemiantes, para reequilibrar la glicemia, son los antirretrovirus, los glucocorticoides, los inmunosupresores, IFN-alfa, los esteroides sexuales, el THS, la píldora, las hormonas de crecimiento, las simpatomiméticas, los medicamentos cardio-vasculares, los diuréticos, los beta-bloqueantes, los inhibidores cálcicos, los psicotrópicos.

Los agentes anti-inflamatorios que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente unos agentes anti-inflamatorios esteroideos (AIS), tales como los corticoides, o no-esteroideos (AINS).

Los inmunomoduladores que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente el tacrolimus, el pimecrolimus y las oxazolininas. Las oxazolininas que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente unas oxazolininas seleccionadas de entre el grupo constituido por la 2-undecil-4-hidroximetil-4-metil-1,3-oxazolina, la 2-undecil-4,4-dimetil-1,3-oxazolina, la (E)-4,4-dimetil-2-heptadec-8-enil-1,3-oxazolina, la 4-hidroximetil-4-metil-2-heptadecil-1,3-oxazolina, la (E)-4-hidroximetil-4-metil-2-heptadec-8-enil-1,3-oxazolina, la 2-undecil-4-etil-4-hidroximetil-1,3-oxazolina. De manera aún más ventajosa, dicha oxazolinina es la 2-undecil-4,4-dimetil-1,3-oxazolina, denominada OX-100 o Cyclocéramide®.

Los agentes hipopigmentantes que se pueden utilizar en asociación son la hidroquinona y sus derivados, la arbutina, el ácido retinoico, el retinol, el retinaldehído, el ácido kójico, el ácido azelaico, la vitamina B3 o PP, los derivados del resorcinol, el resveratrol, unos extractos de regaliz o de morera blanca, el ácido alfa-lipoico, el ácido linoleico, unos quelantes de cationes tales como EDTA (ácido etilendiamina tetra-acético), los extractos de soja. Se pueden citar asimismo el Sepiwhite® (N-undecilenoil-L-fenilalanina) comercializado por la compañía Seppic, que es un agente cosmético despigmentante.

Como ejemplos de agentes pigmentantes, se pueden citar en particular

- los agentes que colorean la piel: la dihidroxiacetona, las melaninas;
- los agentes que estimulan el proceso de pigmentación natural: los psolarenos (8-metoxipsolareno, 5-metoxipsolareno, 4,5',8-trimetilpsolareno o unos extractos vegetales de *Psorelea corylifolia* y de *Ammi majus*), los carotenoides (licopeno, cantaxantina), los agentes que estimulan la vía de AMP cíclico (1. los análogos de AMPc, tales como el 8-bromo-AMPc o el dibutiril-AMPc, 2. la forskolina, 3. la isobutil-metil-xantina o la teofilina), los activadores de proteínas quinasas C (diaciglicerol, en particular oleil-acetil-glicerol), dioles alifáticos o cíclicos (1,2-propanodiol, 5-norbornan-2,2-dimetanol, norbornan-2,2-dimetano), los dioles bicíclicos monoterpénicos, los derivados de tirosina (L-tirosina, L-DOPA), el dimetilsulfóxido, los agentes lisomotrópicos, los dinucleótidos timidina, los fragmentos de ADN, los análogos de la hormona que estimulan los melanocitos, la 3-isobutil-1-metilxantina, los donantes de ácido nítrico (Brown, Journal of

photochemistry and photobiology B: biology 63 (2001) 148-161);

- los extractos vegetales, en particular las algas, que demuestran una actividad promelanógena: *Laminaria digitata* (Thalitan de Codif).

Los extractos naturales de planta que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente unos extractos de aguacate, de altramu, de soja o de girasol, de maíz y de colza, incluso de maca. Se pueden citar los azúcares de aguacate (véase la solicitud internacional WO 2005/115421) o los péptidos de aguacate (véase la solicitud internacional WO 2005/105123).

Los compuestos que contienen unos insaponificables de aceites vegetales que se pueden utilizar en asociación se seleccionan ventajosamente de entre el grupo constituido por los lípidos furánicos de aguacate, los insaponificables de aguacate y de soja, los concentrados de aceite de altramu, los concentrados de aceite de girasol, de maíz y de colza y sus mezclas.

Los lípidos furánicos de aguacate que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente unos 2-alkilfuranos naturales, en particular el activo Avocadofurane[®] comercializado por los laboratorios Expanscience, que pueden ser obtenidos mediante el procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 01/21605.

Los insaponificables de aguacate y de soja que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente una mezcla de insaponificables de aguacate furánico y de insaponificables de soja, en una proporción respectiva de aproximadamente 1/3-2/3. Los insaponificables de aguacate y de soja son aún más ventajosamente el producto Piasclédine[®], comercializado por los laboratorios Expanscience.

Los concentrados de aceite de altramu que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente unos concentrados obtenidos por destilación molecular de aceite de altramu, ventajosamente de aceite de altramu blanco suave, tales como los descritos en la solicitud internacional WO 98/47479. Contienen ventajosamente alrededor del 60% en peso de insaponificables.

Los concentrados de aceite de girasol que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente unos concentrados linoleicos, tales como el activo comercializado por los laboratorios Expanscience, Soline[®] (véase la solicitud internacional WO 01/21150).

Los insaponificables "esterólicos" son unos insaponificables cuyo contenido en esteroides, en metilesteroides y en alcoholes triterpénicos está comprendido entre el 20 y el 95% en peso, preferentemente el 45-65% en peso, con respecto al peso total del insaponificable.

Las plantas hipoglicemiantes que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente seleccionadas de entre el grupo constituido por el fenogreco (*Trigonella graenum*), el ácido corosólico (compuesto activo de las hojas del árbol *Lagestroemia speciosa*), el *Gymnema sylvestre*, el zumo de fruto de momordica (*Momormodica charantia*), el eucalipto (*Eucalyptus globulus*), el *Panax ginseng*, las hojas de arándano (*Vaccinum myrtillus*).

Los oligoelementos que se pueden utilizar en asociación son ventajosamente seleccionados de entre el grupo constituido por el magnesio, el cromo, el selenio, y sus mezclas.

La composición según la invención puede ser formulada en forma de diferentes preparaciones adaptadas a una administración tópica, a una administración oral, rectal, vaginal, nasal, auricular o bronquial, a una administración parenteral.

Según una primera variante, las diferentes preparaciones están adaptadas a la administración tópica e incluyen las cremas, las emulsiones, las leches, las pomadas, las lociones, los aceites, las disoluciones acuosas o hidroalcohólicas o glicólicas, los polvos, los parches, los vaporizadores o cualquier otro producto para aplicación externa.

Según una segunda variante, las diferentes preparaciones están adaptadas a una administración oral; pudiendo el extracto de quinoa entrar o bien en una composición alimenticia, o bien en un complemento alimenticio. El complemento alimenticio se puede presentar o bien en forma del extracto de quinoa como tal (por ejemplo aceite refinado eventualmente enriquecido en su fracción insaponificable), o bien en forma de cápsulas o de cápsulas blandas de gelatina o vegetales en el ámbito de la presente invención. Dicho complemento alimenticio puede contener entonces del 10 al 100% en peso del extracto de quinoa.

Según esta segunda variante de la presente invención, se pueden incorporar, sin ninguna restricción, los extractos de quinoa de la presente invención en los alimentos, las bebidas y los nutracéuticos, incluso en los citados a continuación:

- 1) Los productos lácteos: tales como los quesos, la mantequilla, la leche y otros brebajes lácteos, mezclas y

pastas para untar a base de productos lácteos, helados y yogures;

- 2) Los productos a base de grasa tales como las margarinas, pastas para untar, mayonesas, materias grasas para cocinar, aceites para freír y vinagretas;
- 3) Los productos a base de cereales compuestos por semillas tales como el pan y las pastas, ya estén cocinados, cocidos al horno o transformados;
- 4) Los dulces tales como el chocolate, los caramelos, los chicles, los postres, las coberturas, los sorbetes, los glaseados, y otras guarniciones;
- 5) Las bebidas alcoholizadas o no, incluyendo los sodas y demás bebidas no alcoholizadas, zumos de frutas, complementos dietéticos, sustitutos de comida en forma de brebaje como los vendidos con la marca BoostTM y EnsureTM, y;
- 6) Los productos diversos como los huevos, los alimentos transformados como las sopas, las salsas listas para pastas, los platos preparados y demás productos del mismo género.

La composición de la presente invención puede ser incorporada directamente y sin otra modificación en los alimentos, los nutracéuticos, los productos dietéticos, en particular hiperproteïnados o los brebajes, gracias a unas técnicas como la mezcla, la infusión, la inyección, el mezclado, la absorción, el amasado y la pulverización.

Los modos de administración, las posologías y las formas galénicas óptimas de los compuestos y composiciones según la invención se pueden determinar según los criterios tenidos en cuenta generalmente en el establecimiento de un tratamiento farmacéutico, en particular dermatológico, o veterinario adaptado a un paciente o a un animal como por ejemplo la edad o el peso corporal del paciente o del animal, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento, los efectos secundarios constatados, el tipo de piel. En función del tipo de administración deseada, la composición y/o los compuestos activos según la invención pueden comprender además por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en particular dermatológicamente aceptable. Según la primera variante, se utiliza un excipiente adaptado para una administración por vía tópica externa. La composición según la presente invención puede comprender además por lo menos un adyuvante farmacéuticamente conocido por el experto en la materia, seleccionado entre los espesantes, los conservantes, los perfumes, los colorantes, unos filtros químicos o minerales, los agentes hidratantes, las aguas termales, etc.

La composición que comprende un aceite refinado de quinoa que tiene las especificaciones indicadas está destinada particularmente a una utilización cosmética, dermatológica o alimenticia. En el ámbito de una utilización cosmética o dermatológica, la composición se formulará ventajosamente en forma de una preparación adaptada a una administración tópica. En el ámbito de una utilización alimenticia, con fines nutricionales o cosméticos ("cosmet-food"), la composición se formulará ventajosamente en forma de una preparación adaptada a una administración oral. Podrá no comprender ningún excipiente y estar constituida, en su totalidad, por el aceite de quinoa refinado.

La composición que comprende un aceite refinado de quinoa enriquecido en su fracción insaponificable está destinada particularmente a una utilización cosmética, dermatológica o alimenticia. En el ámbito de una utilización cosmética o dermatológica, la composición estará ventajosamente formulada en forma de una preparación adaptada a una administración tópica. En el ámbito de una utilización alimenticia, con fines nutricionales o cosméticos ("cosmet-food"), la composición se formulará ventajosamente en forma de una preparación adaptada a una administración oral. Podrá no comprender ningún excipiente y estar constituida, en su totalidad, por el aceite de quinoa refinado concentrado en su fracción insaponificable.

La composición que comprende un insaponificable está particularmente destinada a una utilización cosmética o dermatológica. La composición se formulará ventajosamente en forma de una preparación adaptada a una administración tópica.

La composición que comprende un extracto peptídico está particularmente destinada a una utilización cosmética o dermatológica. La composición se formulará ventajosamente en forma de una preparación adaptada a una administración tópica.

Se da a conocer asimismo la utilización de un extracto de quinoa, seleccionado de entre un extracto peptídico y osídico de quinoa o un extracto lipídico de quinoa, siendo dicho extracto lipídico de quinoa a su vez seleccionado de entre el grupo constituido por un aceite concentrado en su fracción insaponificable, un insaponificable o un aceite refinado que tiene las especificaciones dadas en la tabla 2, para la preparación de una composición dermatológica o de un alimento funcional.

Un alimento funcional es un alimento convencional, o que tiene su aspecto, que forma parte de la alimentación normal, y que tiene por característica procurar unos efectos fisiológicos beneficiosos que superan sus funciones nutricionales habituales o reducir el riesgo de enfermedades crónicas.

Se da a conocer asimismo un método de tratamiento cosmético, de cuidado higiénico, de embellecimiento y/o un método para perfumar unas mucosas y/o unas pieles normales, secas, grasas, mixtas, deshidratadas, envejecidas, sensibles, irritadas, incómodas, intolerantes, que presentan un desequilibrio relacionado con el envejecimiento intrínseco, extrínseco u hormonal, o relacionado con las agresiones exógenas (contaminantes, UV, estrés, etc.), con tendencia alérgica, que presentan unos trastornos de la pigmentación, que presentan un aspecto poco agraciado relacionado con la sobrecarga de la masa grasa, caracterizada porque consiste en administrar una composición o un alimento funcional según la invención.

Se da a conocer por otra parte un método de tratamiento de los faneros (cabello, pelos, uñas) caracterizado porque consiste en administrar una composición o un alimento funcional según la invención.

En particular, la composición o el alimento funcional están destinados a la prevención y al tratamiento de las reacciones o patologías alérgicas, inflamatorias, irritantes o de los trastornos de la barrera o de la homeostasia

- de la piel, tal como el acné, la dermatitis atópica, la dermatitis seborreica, la rosácea, la psoriasis, los trastornos vasculares, la dermatitis de glúteo, los herpes, las grietas, las picaduras, las grietas en particular de los senos, las quemaduras solares, las inflamaciones debido a los rayos de cualquier tipo, las irritaciones o alergias (mediante agentes químicos, físicos (esfuerzo de tensión: mujeres embarazadas), bacteriológicos, fúngicos o víricos, parasitarios (piojos, sarna, tiña, ácaros, dermatofitos), radiológicos o de radiaciones (UV, IR) o por deficiencia de la inmunidad innata (péptidos antimicrobianos) o adquirida (celulares, humorales, citoquinas)), las estrías, y/o
- de las mucosas (gingivitis (sensibilidades del recién nacido, de higiene, debidas al tabaquismo), parodontopatía, las irritaciones de las zonas genitales masculinas y femeninas externas o internas) y/o
- de los faneros (alopecia, caspa, hirsutismo, dermatitis seborreicas) inmaduros, normales o maduros.

La composición o el alimento funcional pueden estar destinados asimismo a la regeneración tisular y para favorecer la cicatrización, o pueden estar destinados asimismo a proteger y reforzar la barrera cutánea, a regular los trastornos de la pigmentación y a actuar sobre los mecanismos de lipólisis y de lipogénesis.

El aceite refinado de quinoa, eventualmente concentrado en su fracción insaponificable, presenta además las ventajas siguientes: permite disminuir el riesgo de aterogénesis, presenta unas propiedades hipocolesterolemiantes, actúa en la prevención de algunos cánceres y de las enfermedades cardio-vasculares, en la estimulación de la respuesta inmunitaria en las personas mayores, en la reducción del riesgo de cataratas y en el retraso de la progresión de enfermedades neurovegetativas.

Otra ventaja del aceite refinado de quinoa, eventualmente concentrado en su fracción insaponificable, es que se puede utilizar en cosmética ("food-cosmétique"), más particularmente para mejorar el aspecto cutáneo, para hidratar la piel, mantener en su estado la barrera cutánea y el cemento intercorneocitario mediante un aporte en ácidos grasos esenciales y en esteroides, con vistas a prevenir el envejecimiento cutáneo mediante captación de los radicales libres, y como agente anti-inflamatorio o protector solar.

Según una variante preferida de la invención, el aceite refinado de quinoa, concentrado en su fracción insaponificable, se utiliza en el tratamiento de los trastornos relacionados con el tejido dérmico. El tejido conjuntivo dérmico desempeña un papel principal como soporte y apoyo al nivel de la piel, absorbente de choque, y la dermis es en particular responsable de la firmeza y de la flexibilidad. La degeneración de este tejido, asociada a una alteración de la red colagénica (colágenos, en particular de tipo I, III, II y V) o elástica (elastina - inhibición de la síntesis, síntesis imperfecta, degradación de las fibras de colágeno, disminución del número de fibroblastos y de su metabolismo, etc.) pueden por lo tanto tener unas consecuencias importantes sobre:

- el envejecimiento cutáneo (cronológico, extrínseco o foto-envejecimiento y menopáusico), caracterizado en particular por una disminución del número y de la actividad de los fibroblastos, así como una degradación excesiva de la matriz extracelular;
- las estrías, afección de la célula fibroblástica caracterizada por una inflamación, una inhibición de la expresión de los genes que codifican para la fibronectina, los colágenos de tipo I y III y elastina, una transformación de los fibroblastos en miofibroblastos bajo el efecto de las distensiones mecánicas. Esta degeneración del tejido colagénico conduce a la formación de una cicatriz dérmica atrófica. Los principales factores de activación son: la inflamación y el estrés mecánico y el entorno hormonal (durante el embarazo). Las estrías alcanzan cerca del 50% de la población joven, esencialmente femenina. Se observa generalmente durante el embarazo (del 60 al 70% de las mujeres embarazadas), durante la pubertad (el 25% de las chicas frente al 10% de los chicos), o durante algunas enfermedades (metabólicas, endocrinas e infecciosas). Son lesiones lineales, ligeramente hundidas, estrechas, orientadas en el sentido de las líneas de tensiones cutáneas y recubiertas de una epidermis arrugada. Su color varía según el estado evolutivo: tienen un color rojo, incluso

púrpura al principio, y después adquieren un aspecto blanquecino nacarado en una segunda fase;

- las heridas profundas que alcanzan la dermis, provocan una alteración del tejido dérmico con una disminución del número de los fibroblastos y una degradación de la matriz. El mecanismo de cicatrización se establece para reparar el tejido alterado: los fibroblastos proliferan y la matriz extracelular se remodela: síntesis de los diferentes componentes.

Se da a conocer la utilización de dicho aceite enriquecido en insaponificables para la prevención y/o el tratamiento del envejecimiento cutáneo, de las estrías y de las heridas profundas. Dicho aceite enriquecido en insaponificables puede servir también para favorecer la cicatrización.

Según otra variante ventajosa de la invención, dicho aceite enriquecido en insaponificables se puede utilizar en la prevención y/o el tratamiento de las atrofias sub-cutáneas de la dermis. Las atrofias sub-cutáneas son un problema encontrado frecuentemente en dermatología. Pueden ser secundarias con diferentes etiologías. Según su localización, estas lesiones representan una molestia estética menor o, por el contrario, perjudican seriamente a la persona.

Las atrofias sub-cutáneas pueden tener diferentes etiologías. En primera posición, figuran las atrofias cicatriciales o bien post-traumáticas (traumatismos hasta la dermis), o bien post-inflamatorias (por ejemplo post-acné). Las cicatrices atróficas post-traumáticas comprenden una atrofia epitelial con una membrana basal lineal que muestra la remodelación de la conjunción dermo-epidérmica con una pérdida del patrón papilar. Histológicamente, el grosor de la dermis es reducido, las fibras de colágeno están atenuadas y los fibroblastos frecuentemente más numerosos que en una piel normal. La atrofia dérmica comprende asimismo una hipotrofia de los anexos pilosebáceos y a veces sudorales. Las cicatrices resultantes de un proceso inflamatorio se constituyen más frecuentemente en la dermis profunda y en la hipodermis. Hay un engrosamiento de la dermis que se acompaña de una esclerosis. Los constituyentes de la matriz extracelular son progresivamente sustituidos por unas fibras de colágeno engrosadas y densas. Este proceso de esclerosis se acompaña de una disminución de la vascularización dérmica y de los anexos. Se habla en este estado de esclero-atrofia, un estado que se puede observar en una esclerodermia localizada (morfea). Este proceso puede alcanzar asimismo la hipodermis en un contexto inflamatorio inmunitario (lupus profundo, síndrome de Perry-Romberg), medicamentoso (triterapia, inyección de corticoides), enzimático (citoesteatonecrosis pancreáticas), o traumático (atrofia de la hipodermis en mujeres que llevan medias a medio muslo).

Otras atrofias están catalogadas: después de un tratamiento local con dermocorticoides, después de la menopausia y en asociación o no con THS (tratamiento hormonal sustitutivo), debidas a ciertas enfermedades genéticas o no, hipoplasia, enfermedad del tejido conjuntivo de la piel del colágeno, síndrome de goltz, atrofodermia de Pasini y Pierini, queratosis pilosa atrofiante. Por último, durante los injertos de piel, quemaduras, pérdidas de sustancias cutáneas de cualquier origen, escaras.

Por lo tanto, se propone subsanar la atrofia de la dermis mediante un tratamiento a base de concentrado (= aceite enriquecido en insaponificable) de quinoa que reactiva la actividad proteica.

En particular, la presente invención tiene por objeto una composición que comprende un aceite concentrado en su fracción insaponificable, que tiene las especificaciones dadas anteriormente (tabla 3) para su utilización:

- en la prevención y/o el tratamiento de las heridas profundas,
- para favorecer la cicatrización, o
- en la prevención y/o el tratamiento de las atrofias subcutáneas de la dermis.

La presente invención tiene asimismo por objeto un método de tratamiento cosmético que pretende prevenir o tratar el envejecimiento cutáneo o las estrías utilizando la composición que comprende un aceite concentrado en su fracción insaponificable, que tiene las especificaciones dadas anteriormente (tabla 3).

La presente invención tiene asimismo por objeto una composición que comprende un extracto peptídico y osídico de semillas de quinoa, susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- a) a partir de semillas de quinoa, extraer un aceite crudo y una torta, y recuperar dicha torta;
- b) lavar dicha torta mediante agua o una mezcla hidroalcohólica para conservar sólo la parte proteica, y después
- c) solubilizar las proteínas;
- d) concentrar de las proteínas y después hidrolizar dichas proteínas en péptidos;
- e) purificar y recuperar el extracto peptídico y osídico,

y, llegado el caso, un excipiente apropiado,

para su utilización:

- para favorecer la cicatrización;
- en la prevención y/o el tratamiento del acné;
- para regular los trastornos de la pigmentación; o
- en la prevención y/o el tratamiento de los hirsutismos o de las dermatitis seborreicas.

La invención tiene asimismo por objeto un método de tratamiento cosmético de los faneros, en particular del cabello, del pelo o de las uñas, de la alopecia, de la caspa, o de las pieles normales, secas, grasas, mixtas, deshidratadas, envejecidas o sensibles, que consiste en administrar una composición que comprende un extracto peptídico y osídico de semillas de quinoa, susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- a) a partir de semillas de quinoa, extraer un aceite crudo y una torta, y recuperar dicha torta;
- b) lavar dicha torta mediante agua o una mezcla hidroalcohólica para conservar sólo la parte proteica, y después
- c) solubilizar las proteínas;
- d) concentrar las proteínas y después hidrolizar dichas proteínas en péptidos;
- e) purificar y recuperar el extracto peptídico y osídico.

Ventajosamente, el extracto peptídico y osídico está constituido por 25 a 90% en peso de péptidos y por 10 a 50% en peso de azúcares, estando los porcentajes expresados en peso con respecto al peso total de dicho extracto peptídico y osídico.

Según una variante preferida de la invención, el extracto peptídico y osídico de quinoa se utiliza en la cicatrización epidérmica.

Una perturbación de la integridad de la piel puede aparecer en varios contextos. La piel puede sufrir daños durante cirugías, quemaduras, radiaciones, cortes, arañazos, fricciones y presiones. El grado de gravedad de la herida varía según algunos factores como la superficie, la profundidad y la naturaleza. Con el fin de mantener las funciones esenciales de la piel, es muy importante repararla cuando se produce dicha circunstancia. La curación de una herida cutánea representa el conjunto de los procesos que llevan al cierre de la herida y a la recuperación funcional del tejido cutáneo. La epidermis se cura mediante regeneración o re-epitelialización, es decir que recupera su estructura y sus funciones originales. Incapaz de responder a una lesión mediante regeneración, la dermis se cura mediante reparación, es decir que el tejido de origen es sustituido por un tejido conjuntivo no específico con, como resultado, la formación de una cicatriz menos funcional (por ejemplo resistencia mecánica inferior). Estos procesos implican unas poblaciones celulares diferentes, unos compartimentos celulares distintos (epidermis y dermis), diversos mediadores y unas interacciones múltiples entre todos estos elementos, variando el conjunto en función del tiempo.

La re-epitelialización consiste en la regeneración por los queratinocitos de un epitelio organizado, escamoso, estratificado, queratinizado, que recubre la herida y que reforma una barrera protectora contra el entorno exterior con el fin de reducir la mortalidad tras una herida. El mecanismo de re-epitelialización se lleva a cabo según 3 etapas que se desarrollan en paralelo pero de manera desplazada en el tiempo: (1) migración de los queratinocitos (la migración celular puede estar influenciada por varios mecanismos, tal como la pérdida de inhibición de contacto; la presencia de mediadores inflamatorios como los factores de crecimiento, o de proteínas segregadas por las células, pero también por los diferentes contactos con sustratos de la matriz como la fibronectina y la laminina 5); (2) proliferación celular (una onda mitótica se produce para rellenar el espacio dejado por las células migratorias y para recubrir la lesión. La proliferación de los queratinocitos que se produce después de 48 a 72 horas, no parece afectar a la migración. Se efectúa bajo la influencia de numerosos factores que pueden ser segregados por las células cercanas como los fibroblastos o los queratinocitos en sí: KGF (Keratinocyte growth Factor), IL-1, IL-6, IL-8, Colony Stimulating Factor (CSF), PDGF, TNF- α , IGF-1 (Insulinase Growth Factor)), (3) maduración de la epidermis (la maduración y la diferenciación de la epidermis se realizan simultáneamente con el cierre de la herida y corresponden a una reanudación de la función y de la morfología normal de los queratinocitos). Los queratinocitos se activan, adaptan su morfología a la migración, migran y proliferan bajo la influencia de diferentes factores de crecimiento para re-epitelializar la herida. Con el desarrollo del recubrimiento de la herida, la neo-dermis empieza su maduración con el fin de volver a formar una capa córnea protectora.

Ciertos factores de crecimiento, que controlan la migración de los queratinocitos, son también capaces de influenciar la migración. Es el caso de EGF y de TGF- β , que la estimulan aumentando la expresión de la integrina $\alpha 2 \beta 1$ en la superficie de los queratinocitos, pero también del TGF β que es uno de los factores principales implicados en la migración y que actúa activando la síntesis matricial.

La interacción célula-matriz es importante durante la cicatrización de la herida. En efecto, la matriz extracelular contiene unas sustancias adhesivas y unas fibras que guían las células migratorias. De la misma manera, unas moléculas presentes en la sangre pueden contribuir a la migración celular. Por ejemplo, la fibrina y la fibronectina, que están vinculadas a la matriz provisional y forman una estructura en la que los queratinocitos pueden migrar. Los queratinocitos en migración elaboran asimismo unos elementos de esta matriz. Los queratinocitos sintetizan la laminina 5, el colágeno V y el antígeno del penfigoide ampolloso. El efecto de diversos sustratos sobre la migración

de los queratinocitos está intervenido por unas integrinas, y la secreción de proteasas de la matriz extracelular (MMP-1, MMP-2 y MMP-9), que les permiten sucesivamente engancharse y liberarse de estos sustratos.

La laminina 5 es una proteína específica de las láminas basales de los epitelios que tienen unas funciones de secreción o de protección, como las mucosas o la piel. La laminina 5 está considerada como el componente clave del complejo de anclaje de la epidermis y como la proteína que contribuye más a la estabilidad de la membrana basal. La laminina 5 resulta del ensamblaje heterotrimérico de sub-unidades $\alpha 3$, $\beta 3$ y $\gamma 2$, y está sintetizada exclusivamente por las células epiteliales en forma de un precursor. El papel principal de la laminina 5 está subrayado por la existencia de enfermedades hereditarias o adquiridas, que resultan de una anomalía de síntesis y/o de expresión de una de sus sub-unidades constitutivas. Estas enfermedades, denominadas epidermólisis ampollosas de la unión, conducen en particular a una fragilidad de la conjunción dermo-epidérmica de la piel caracterizada por la formación espontánea de ampollas epidérmicas. Así, la laminina 5 tiene un papel biológico determinante ya que permite la adherencia de las células epiteliales adyacentes. Además de su papel en la adherencia estable, la laminina 5 desempeña un papel importante durante la migración celular ya que está fuertemente expresada por los queratinocitos migratorios en las fases precoces de la cicatrización epidérmica. En la piel normal, hay poco o ningún marcado de la laminina 5 en el citoplasma de los queratinocitos basales mientras que en una herida en curación, la laminina 5 se detecta en las células basales. La forma larga de la laminina 5 interactúa con las integrinas $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$, que son dos receptores encontrados en las placas de adhesión focal útiles para el movimiento celular. La integrina $\alpha 2\beta 1$ parece estar implicada de manera preponderante en la migración de los queratinocitos. Durante la migración, la regulación de la expresión de la laminina 5 está intervenida por el TGF- β y el INF- γ .

La cicatrización cutánea está asociada a unos acontecimientos de migración y de remodelación de la matriz que recurren a la acción de las metaloproteasas matriciales (MMP). Los queratinocitos se desplazan por lo tanto a través de una matriz temporal a la que degradan cuando es necesario para facilitar su migración y cuya composición modificaran progresivamente. Las MMP constituyen una familia de enzimas, zinc-dependientes, de estructura muy conservada, y que poseen la capacidad de degradar los componentes de la matriz extracelular. Pueden ser sintetizadas mediante diferentes tipos celulares al nivel de la piel (fibroblastos, queratinocitos, macrófagos, células endoteliales, eosinófilas, células de Langerhans, etc.). El papel preponderante de las MMP en la remodelación proteolítica de la matriz extracelular está ahora claramente establecido en la cicatrización cutánea. El efecto de los diversos sustratos en la migración de los queratinocitos está mediado por la secreción de proteasas de la matriz extracelular: MMP-1, MMP-2 y MMP-9, que les permiten sucesivamente engancharse y liberarse de estos sustratos. La MMP-9 está expresada de manera preponderante durante la cicatrización cutánea e interviene en la fase de migración y de remodelación de la matriz. Esta proteasa sería asimismo un elemento principal de una cicatrización sin cicatriz.

Ahora bien, se ha demostrado que el extracto para favorecer la cicatrización según la invención actúa directamente sobre las 2 primeras etapas implicadas en la re-epitelialización (migración y proliferación celular).

- Estimulación de la migración de los queratinocitos:
 - ° Acción sobre la expresión de los genes que codifican para las 3 cadenas que comprenden la laminina 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$);
 - ° Acción sobre la síntesis de la MMP-9 a través de un aumento de la expresión de su gen;
 - ° Acción sobre la migración de los queratinocitos
- Estimulación de la proliferación de los queratinocitos:
 - ° Acción directa sobre la proliferación celular
 - ° Acción indirecta de los fibroblastos: secreción de más KGF: factor de crecimiento que activa la división celular de los queratinocitos.

Así, la invención tiene por objeto la utilización de un extracto peptídico y osídico de quinoa, tal como se ha descrito anteriormente, para favorecer la cicatrización. En particular, dicho extracto peptídico y osídico se puede utilizar en la prevención y/o el tratamiento de las cicatrices superficiales tales como: las cicatrices post-acné, las cicatrices post-exfoliación, las cicatrices post-láser, las cicatrices post-quemaduras y los arañazos. Dicho extracto peptídico y osídico puede ser utilizado asimismo como cuidado (cosmético) para los labios frágiles y la queilitis. Dicho extracto peptídico y osídico puede ser utilizado asimismo en la prevención del envejecimiento cutáneo, debido a un defecto de cicatrización con la edad. Este extracto peptídico y osídico puede ser utilizado asimismo en el tratamiento y/o prevención de las estrías.

Este extracto peptídico y osídico puede ser utilizado asimismo para reparar la piel después de una picadura

(mosquitos). Permite asimismo una reparación de las abrasiones de la piel mediante mecanismos físicos (raspado, prurito, fricción mecánica, radiación láser), químicos o bioquímicos (exfoliación, eritema del glúteo, por ejemplo). En particular, este extracto se puede utilizar en el tratamiento cosmético de los granos y/o de las costras, que permite una reparación de la piel después de unos granos debidos a unas patologías tales como el acné o las varicelas, y/o de las costras debidas a unas patologías (atopia, costras de leche).

Este extracto peptídico y osídico encuentra asimismo una aplicación en el tratamiento cosmético de las pieles frágiles y sensibles.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, pero no son limitativos.

Ejemplo 1: aceite refinado de quinoa (desodorizado): procedimiento de preparación y especificaciones

El aceite refinado de quinoa se obtiene mediante extracción con disolvente (n-hexano) de las semillas de quinoa (1000 kg, rendimiento del 5,5%), y obtención del aceite crudo de quinoa (55 kg). Este aceite crudo se refina después (rendimiento del 70%) para dar el aceite de quinoa refinado (38,5 kg). Se obtiene un aceite de color amarillo turbio con depósito; no se encuentra ninguna traza de hexano.

El aceite refinado de quinoa desodorizada presenta las especificaciones siguientes:

Índice de peróxido: 7,3 meq/kg; Índice de ácido: 0,30 mg KOH/g

Composición en ácidos grasos: C14 0,1%; C16 8,2%; C16' 0,2%; C18 0,8%, C18' 30,4%, C18'' 47,2%; C18''' 8,3%; C20 0,6%; C20' 1,7%, C22 0,7%; C22' 1,6%; C24 0,2%.

Contenido en tocoferoles totales: 4,8 mg/100 g

% relativo de α -tocoferol: 22,3%; % relativo de β -tocoferol: 0,0%; % relativo de γ -tocoferol: 61,5%; % relativo de δ -tocoferol: 16,2%

Contenido en esteroides totales: 1,63 g/100 g

% relativo de campesterol: 1,53%; % relativo de estigmasterol: 3,19%; % relativo de β -sitosterol: 20,00%; % relativo de δ -5-avenasterol: 1,7%; % relativo de δ -7-estigmasterol: 46,35%; % relativo de δ -7-avenasterol: 8,55%

Contenido en escualeno: 2,5 g/100 g

Ejemplo 2: aceite refinado de quinoa concentrado en su fracción insaponificable (= concentrado de aceite de quinoa): procedimiento de preparación y especificaciones

El aceite de quinoa refinado (desodorizado, 38,5 kg) se somete a una etapa de destilación molecular para dar un aceite refinado de quinoa concentrado en su fracción insaponificable, también denominado concentrado de aceite de quinoa (3,85 kg, rendimiento del 10%).

El aceite refinado de quinoa desodorizado concentrado en su fracción insaponificable presenta las especificaciones siguientes:

Aceite de color amarillo turbio con depósito; no se encuentra ninguna traza de hexano.

Índice de peróxido: 1,43 meq/kg; Índice de ácido: 3,04 mg KOH/g

Composición en ácidos grasos: C14 0,3%; C16 12,4%; C16' 0,3%; C18 0,7%; C18' 29,4%; C18'' 47,1%; C18''' 7,7%; C20 0,3%; C20' 0,9%; C22 0,3%; C22' 0,6%; C24 0,1%.

Contenido en tocoferoles totales: 58,7 mg/100 g

% relativo de α -tocoferol: 72,3%; % relativo de β -tocoferol: 0,7%; % relativo de γ -tocoferol: 23,1%; % relativo de δ -tocoferol: 4,0%;

Contenido en esteroides libres: 0,4 g/100 g

Contenido en esteroides totales: 7,73 g/100 g

% relativo de campesterol: 5,57%; % relativo de estigmasterol: 3,4%; % relativo de β -sitosterol: 26,84%; % relativo de δ -5-avenasterol: 2,3%; % relativo de δ -7-estigmasterol: 39,48%; % relativo de δ -7-avenasterol: 5,97%

Contenido en escualeno: 16,8 g/ 100 g

Ejemplo 3: extracto peptídico y osídico de quinoa: procedimiento de preparación y especificaciones

Un extracto peptídico y osídico de quinoa se preparó según el protocolo siguiente:

Materia prima de partida: torta de quinoa, al 10-12% de proteínas en peso con respecto al peso de la materia seca (MS = materia seca). Esta torta de quinoa se somete a una extracción alcalina (ajuste del pH a pH 10). El sobrenadante se somete después a una ultrafiltración con la ayuda de membranas minerales de 8 kDa (enriquecimiento en proteínas). Después, el retentado se somete a una etapa de concentración antes de la etapa de hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática de las proteínas se realiza con la Prolyve 1000, a una temperatura de 55°C, a un pH de 8. Al final de la etapa de hidrólisis enzimática, la enzima se desactiva mediante un tratamiento térmico. El hidrolizado se somete después a una etapa de ultrafiltración con la ayuda de membranas minerales de 8 kDa (recuperación de los péptidos en el filtrado). El ultrafiltrado se concentra, y después se somete eventualmente a una filtración esterilizante sobre 0,2 µm y/o se liofiliza.

El extracto peptídico y osídico de quinoa presenta las especificaciones siguientes: polvo de color amarillo anaranjado sin conservantes.

Composición con respecto al polvo (% p/p)

Nitrógeno α-aminado (OPA, equivalente leucina): 13% ± 20%

Proteínas (Biuret, equivalente BSA): 27 % ± 20%

Azúcares totales (antrona, equivalente glucosa): 24% ± 20%

Masa molar (Da)	>3500	3500 - 1200	1200 - 300	300 - 130	< 130
Distribución de los péptidos (%)					
	2	15,5	44,5	15	23

Tabla 5: perfil de distribución de las masas molares de los péptidos y aminoácidos

Ejemplo 4: aceite refinado de quinoa concentrado en su fracción insaponificable (= concentrado de aceite de quinoa): actividades biológicas

Se ha evolucionado el efecto del concentrado del aceite de quinoa, obtenido en el ejemplo 2, sobre diferentes parámetros de la matriz dérmica: (a) efecto sobre la proliferación de los fibroblastos, (b) efecto sobre la matriz extracelular de la dermis: expresión génica del colágeno I, colágeno III y de la elastina, (c) efecto sobre la distensión mecánica de la dermis: efecto sobre las fuerzas isométricas desarrolladas por unos fibroblastos procedentes de estrías rojas.

Material y métodos:

a: Estudio de la proliferación de los fibroblastos dérmicos

El ensayo con MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] es un ensayo colorimétrico que mide la viabilidad celular. El MTT es una sal de tetrazolio hidrosoluble de color amarillo; las células metabólicamente activas son capaces de reducirlo en cristales de formazán azules.

El D0, los fibroblastos son inoculados en medio RPMI con 1% SVF en placa de 96 pocillos. El D1, las células son tratadas mediante el concentrado de aceite de quinoa en medio RPMI al 1% SVF al 0,005% y al 0,01% de materia seca (MS) o en medio RPMI al 10% SVF (control positivo) durante 24 y 48 horas.

Al final del tratamiento, la viabilidad celular se cuantifica mediante un ensayo con MTT: después de 3 horas de contacto con el MTT, los cristales de formazán formados son solubilizados mediante DMSO y la densidad óptica, proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas por lo tanto vivas, se lee a 570 nm frente al blanco (pocillo sin células).

b. Estudio del efecto de los péptidos de quinoa sobre la expresión de los genes que codifican el colágeno I y el colágeno III y la elastina mediante RT-PCR

b1. Principio de la PCR cuantitativa en tiempo real:

La PCR cuantitativa en tiempo real o QRT-PCR (por Quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction) es un método de biología molecular, que permite medir de manera específica y cuantitativa la expresión de genes de interés por amplificación. La cuantificación se basa en el seguimiento de la amplificación de los genes en tiempo real

utilizando como sistema transportador la tecnología SYBR Green: molécula con propiedades fluorescentes que se intercala dentro del ADN bicatenario. La PCR se desarrolla en una sucesión de ciclos de temperatura según 3 etapas:

- 5 - Desnaturalización: separación de las 2 cadenas de ADN.
- Hibridación: reconocimiento de una secuencia de ADN que corresponde a un gen diana gracias a los cebadores específicos.
- 10 - Extensión: de la secuencia de interés por acción de una polimerasa.

Al final de la reacción, la cuantificación se realiza analizando el "ciclo límite" (Ct = punto en el que la señal de emisión de fluorescencia será estadística y significativamente más elevada que el ruido de fondo). Las cantidades de ADN se comparan en la parte exponencial, momento durante el cual el aumento de la cantidad de ADN es proporcional a la cantidad inicial de matriz.

b.2. Protocolo:

El D0, los fibroblastos se han inoculado en placas de 6 pocillos en medio RPMI adicionado con 10% de SVF. El D1, los fibroblastos se han tratado mediante TGFβ1 a 5 ng/ml o el concentrado de aceite de quinoa al 0,005% y 0,01% MS en medio RPMI al 1% de SVF durante 48 horas. Al final del tratamiento de las células, los ARN totales se han extraído (kit de extracción RNeasy MiniKit; Quiagen) y después se han dosificado de manera cuantitativa en minichips con la ayuda del sistema Experion (kit Experion RNA StdSens; Biorad). Los ARN totales se han retro-transcrito después en ADNc (kit iScript cDNA Synthesis; Biorad). Por último, los ADNc neo-sintetizados relativos a los genes de interés (colágeno I, colágeno III, elastina) o a los genes de referencia (HPRT, GAPDH, YWHAZ, beta actina = normalizadores) se han amplificado selectivamente por PCR en tiempo real (iQ5, Biorad) utilizando unos cebadores específicos de las secuencias dianas.

La expresión de los genes de referencia se analiza en las mismas muestras que aquéllas para las cuales se evalúa la expresión de los genes de interés con el fin de normalizar los resultados y asegurar que son realmente el resultado del efecto del tratamiento por el concentrado de aceite de quinoa.

b.3. Análisis de resultados:

Los resultados están normalizados con respecto al gen de referencia más estable (según el algoritmo geNorm): $DCt = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen de referencia más estable}$.

La variación del número de copias del gen de interés durante el tratamiento se calcula a continuación según la fórmula siguiente: $DDCt = DCt \text{ control} - DCt \text{ tratamiento}$

Por último, la cantidad relativa o el nivel de expresión de los genes de interés normalizado por el nivel de expresión de los genes de referencia en las muestras no tratadas y tratadas se obtiene mediante la fórmula: $QR = 2DDCt$.

c. Evaluación del efecto sobre las fuerzas isométricas desarrolladas por unos fibroblastos procedentes de estrías rojas

c.1. Presentación del sistema GlaSbox®

La inhibición mecánica de la retracción del gel de colágeno en el que están incluidos los fibroblastos se traduce por la generación de una fuerza denominada "fuerza de retracción" o "fuerza isométrica".

Las retículas se desarrollan en una caja de cultivo constituida por 8 depósitos rectangulares. En cada una de ellas se introducen dos láminas flexibles de silicio cuyas partes inferiores están constituidas por rejillas sobre las cuales se enganchan las retículas durante su polimerización. La retícula se desarrolla entre dos láminas para dar una forma rectangular ligeramente estrechada en su centro. Esta forma en mecánica clásica se designa como una forma de diábolo. Estas láminas están equipadas, al nivel de su parte superior, con un sistema de indicador de nivel de tensión recubierto de hilos de oro depositados en su superficie. Bajo la influencia de la fuerza de retracción desarrollada por los fibroblastos, las láminas de silicio se deforman. Esto se traduce por una variación del valor de resistencia eléctrica del indicador de nivel de tensión, medido por medio de un puente de Wheastone. Esta variación indica la fuerza desarrollada dentro de la retícula, medida en tiempo real por medio de una tarjeta de adquisición PC y de un programa adaptado.

c.2 Preparación de las dermis equivalentes bajo tensión y medición de las fuerzas isométricas

Un medio de fabricación de las retículas se prepara mezclando: 6 volúmenes de medio de cultivo con 3 volúmenes de colágeno I de cola de rata (2 mg/ml) y un volumen de suspensión celular (8,105 células/ml), la mezcla se vierte

en los depósitos rectangulares de Glasbox. En algunos minutos a 37°C, se constituye un gel. Se añaden los diferentes medios que contienen o no el principio activo. Las fuerzas isométricas se miden durante 48 horas. Al final de la manipulación, las retículas de colágeno son separadas y digeridas en una disolución de collagenasa. Después de 2 horas de incubación a 37°C, se cuentan las células en cada retícula de colágeno. Las fuerzas están expresadas en función del número de células después de 48 horas de manipulación.

c.3. Análisis estadístico:

Los valores están expresados por la media $\pm$ error tipo de la distribución de las medias (sem). Se ha realizado un análisis de varianza de 2 factores.

Resultados

a. Proliferación de los fibroblastos:

El tratamiento de los fibroblastos por el concentrado de aceite de Quinoa al 0,005 y 0,01% MS, estimula de manera dosis-dependiente y significativamente la proliferación (respectivamente: +17 y +23% de aumento con respecto al control sin tratamiento, después de un tratamiento durante 48h).

	24H de tratamiento			48H de tratamiento		
	Media DO MTT	% de aumento	Ensayo t de Student	Media DO MTT	% de aumento	Ensayo t de Student
Control	0,754	100		0,675	100	
Control positivo (RPMI-10% de SVF)	0,900	119	p<0,01	1,249	185	p<0,01
Concentrado de aceite de quinoa (0,005%)	0,769	112	p<0,05	0,753	117	p<0,01
Concentrado de aceite de quinoa (0,01%)	0,843	120	p<0,01	0,793	123	p<0,05

Tabla 6: Estudio de la proliferación de los fibroblastos en presencia del concentrado de aceite de quinoa

b. Expresión del colágeno I:

El análisis cuantitativo de la cinética de expresión del ARNm del colágeno I se ha realizado mediante PCR cuantitativa (Q-PCR) después de 48 horas de incubación con TGF- β 1 a 5 ng/ml. Los resultados obtenidos indican una inducción importante de la expresión del gen colágeno I (tabla 7). El concentrado de aceite de quinoa estimula asimismo de manera dosis-dependiente la expresión del colágeno I (+58 y +67%).

	Media dCt	ddCt	QR	% de inducción
Control	-2,3	0,00	1,00	
TGF β a 5 ng/ml	-3,2	0,9	1,87	87
Concentrado de aceite de quinoa 0,005%	2,96	0,66	1,58	58
Concentrado de aceite de quinoa 0,01%	-3,04	0,74	1,67	67

Tabla 7: Estudio de la expresión génica del colágeno I

c. Expresión del colágeno III:

Por otra parte, se ha analizado el efecto del concentrado de aceite de quinoa sobre la expresión del gen del colágeno III. Los resultados presentados en la tabla 8 demuestran un aumento importante de la expresión del gen colágeno III (+92 y +62%).

	Media dCt	ddCt	QR	% de inducción
Control	4,92	0,00	1,00	
TGF β a 5 ng/ml	2,51	2,4	5,27	427
Concentrado de aceite de quinoa 0,005%	3,97	0,94	1,92	92
Concentrado de aceite de quinoa 0,01%	4,22	0,69	1,61	62

Tabla 8: Estudio de la expresión génica del colágeno III

d. Expresión de la elastina: se ha demostrado asimismo un efecto del concentrado de aceite de quinoa sobre la expresión del gen de la elastina (tabla 9), con una inducción de +96 y +67% con respecto al control sin tratamiento.

	dCt	ddCt	QR	% de inducción
Control	4,58	0,00	1,00	
TGF β a 5 ng/ml	2,16	2,4	5,35	435

	dCt	ddCt	QR	% de inducción
Concentrado de aceite de quinoa 0,005%	3,61	0,97	1,96	96
Concentrado de aceite de quinoa 0,01%	3,84	0,74	1,67	67

Tabla 9: Estudio de la expresión génica de la elastina

e. Estudio del efecto del concentrado de aceite de quinoa sobre las fuerzas contráctiles desarrolladas por los fibroblastos de estrías rojas en una dermis equivalente bajo tensión en el sistema GlaSbox®.

Tal como se muestra en la figura 2, la adición de 0,01% de concentrado de aceite de quinoa al medio de cultivo disminuye significativamente las fuerzas contráctiles desarrolladas por los fibroblastos de estrías rojas a partir de 1h 30 de cultivo y hasta la 36ª hora. Las curvas obtenidas durante el estudio se componen de 3 fases distintas:

- Fase I: la fuerza isométrica sigue baja durante las dos primeras horas de cultivo. Esta fase corresponde a la polimerización del gel de colágeno.
- Fase II: la fuerza isométrica aumenta casi linealmente hasta un máximo, que se sitúa como media durante las seis a ocho primeras horas de cultivo. Esta fase corresponde al tiempo que necesitan los fibroblastos para alargarse y vincularse a las fibras de colágenos.
- Fase III: la fuerza isométrica se mantiene durante el tiempo de cultivo.

Esta fase corresponde a la remodelación de la matriz de colágeno por los fibroblastos y el aumento de la expresión de la integrina $\alpha 2\beta 1$.

El concentrado de aceite de quinoa tiene un efecto relajante que se mantiene en el tiempo ya que disminuye las fuerzas isométricas desarrolladas por los fibroblastos procedentes de estrías rojas al mismo tiempo durante la fase II y la fase III de la curva.

Figura 2: Fuerzas contráctiles desarrolladas en una dermis equivalente bajo tensión en el sistema GlaSbox® durante 48 horas de cultivo (B) (A: detalle de las 6 primeras horas) (media $\pm$ sem) en presencia o ausencia del concentrado de aceite de quinoa (Q1102) (*p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 frente a FS [Fibroblastos Sanos]; #p<0,05 y ##p<0,01 frente a FVR [Fibroblastos de Estrías Rojas])

Conclusión

Los estudios presentados en la presente memoria han permitido demostrar el papel del concentrado de aceite de quinoa sobre la regulación del tejido dérmico. En efecto, se ha mostrado que el concentrado de aceite de quinoa conlleva: (a) la estimulación de la proliferación de los fibroblastos, (b) la inducción de la expresión del colágeno I, colágeno III y de la elastina por los fibroblastos, (c) la modificación de las propiedades mecánicas de los fibroblastos de estrías rojas: efecto relajante transitorio y a largo plazo.

Estimulando la síntesis de los diferentes componentes de la matriz extracelular, el concentrado de aceite de quinoa puede desempeñar un papel importante en la restauración y la regulación de la homeostasia dérmica en caso de alteración (pieles envejecidas, agredidas, estrías, cicatrices, etc.).

Ejemplo 5: extracto peptídico y osídico de quinoa (= péptidos de quinoa): actividades biológicas

Se ha evaluado la actividad de los péptidos de quinoa, obtenidos en el ejemplo 3, sobre los dos primeros mecanismos implicados en la re-epitelización cutánea (evaluación a dos concentraciones: 0,05% MS y 0,1% MS):

- la migración de los queratinocitos: (i) evaluación del efecto sobre la expresión de los genes que componen la laminina 5, (ii) evaluación del efecto sobre la expresión y la síntesis de MMP-9 y (iii) evaluación del efecto funcional sobre la migración de los queratinocitos
- la proliferación de los queratinocitos: (i) evaluación del efecto sobre la proliferación de los queratinocitos, (ii) evaluación del efecto sobre la síntesis de KGF por los fibroblastos.

Material y métodos

a. Estudio del efecto de los péptidos de quinoa sobre la expresión de los genes que codifican para la laminina 5 y la MMP-9 por RT-PCR

- principio de la PCR cuantitativa en tiempo real: véase el ejemplo 4
- Protocolo:

El D0, los queratinocitos se han inoculado en placas de 24 pocillos en un medio KGM-2. El D1, las células se han tratado mediante TGFβ1 a 5 ng/ml o los péptidos de quinoa a 0,05 y 0,1% MS durante 48 horas. Al final del tratamiento de las células, se han extraído los ARN totales (kit de extracción RNeasy MiniKit; Qiagen) y después dosificado de manera cuantitativa en minichips con la ayuda del sistema Experion (kit Experion RNA StdSens; Biorad). Los ARN totales se han retro-transcrito después en ADNc (kit iScript cDNA Synthesis; Biorad). Por último, los ADNc neo-sintetizados relativos al gen de interés (genes que codifican para las 3 cadenas que componen la laminina 5: α3β3δ2 y MMP-9) o a los genes de referencia (HPRT, GAPDH, YWHAZ, beta actina = normalizadores) se han amplificado selectivamente por PCR en tiempo real (iQ5, Biorad) utilizando unos cebadores específicos de las secuencias dianas.

La expresión de los genes de referencia se analiza en las mismas muestras que aquellas para las cuales se evalúa la expresión de los genes de interés con el fin de normalizar los resultados y asegurarse bien de que son el resultado del efecto del tratamiento por los péptidos de quinoa.

- Análisis de resultados: los resultados están normalizados con respecto al gen de referencia más estable, véase el ejemplo 4.

b. Estudio de la migración de los queratinocitos

Se revisten unos soportes de cultivos plásticos con colágeno I; se reviste un soporte de control con gelatina (la migración sobre gelatina es claramente más baja que sobre colágeno nativo). Los queratinocitos se han inoculado en las cajas revestidas y se han eliminado las células no adherentes después de 6 horas de incubación a 37°C y al 5% de CO₂. Se ha sustituido después el medio de cultivo por un medio que contiene o no los péptidos de quinoa al 0,1%. Después de una noche de incubación, se han bloqueado las divisiones celulares mediante incubación durante 2 horas con una disolución de mitomicina C. Se ha realizado una cicatriz artificial, reproducible, sobre las alfombras celulares y, después de los lavados, se ha renovado el tratamiento. Después de 48 horas, las células se han fijado y se han marcado los núcleos mediante el colorante fluorescente de Hoechst.

Se han tomado unas imágenes cada día. Se efectúa un análisis de migración de los queratinocitos entre la imagen tomada en el momento D0 (que permite la selección de la cicatriz artificial) y la imagen "Hoechst" realizada en D2 que permite el recuento del número de células migratorias.

c. Estudio de la proliferación de los queratinocitos mediante el método con MTT

El D0, se inoculan los queratinocitos en medio KGM2 en placas de 96 pocillos. El D1, se tratan las células mediante ácido transretinoico (ATRA) al 1 μM o los péptidos de quinoa al 0,005% y 0,1% MS durante 24 y 48 horas. Al final del tratamiento, la viabilidad celular se cuantifica mediante un ensayo con MTT: después de 3 horas de contacto con MTT, se solubilizan por DMSO los cristales de formazán formados y la densidad óptica, proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas, por lo tanto vivas, se lee a 570 nm frente al blanco (pocillo sin células).

d. Dosificación de MMP-9 segregada por los queratinocitos

Los queratinocitos se han inoculado en placas de 24 pocillos; después de 24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂, se han tratado las células mediante los péptidos de quinoa al 0,05% y 0,1% MS. El TGFβ ensayado a 5 ng/ml se ha utilizado como control positivo. Después de 48 y 72 horas de tratamiento, la cantidad de MMP-9 segregada por las células se ha dosificado en el sobrenadante de cultivo con la ayuda de un kit ELISA (R&D Systems), según el protocolo preconizado por el fabricante. En paralelo, la cantidad de células vivas por pocillo se ha dosificado mediante un ensayo colorimétrico rojo neutro: la DO, proporcional a la cantidad de células vivas, se lee a 570 nm.

La cantidad de MMP-9 se expresa por células vivas: (ng/ml)/DO570 MTT.

e. Dosificación del KGF segregado por los fibroblastos

Los fibroblastos se han inoculado en placas de 24 pocillos en RPMI al 1% de SVF; después de 24 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂, se han tratado las células mediante los péptidos de quinoa al 0,005% y 0,1% MS. Se ha utilizado como control positivo la IL1α (Sigma) a 100 ng/ml. Después de 24 y 48 horas de tratamiento, la cantidad de KGF lixiviado por los fibroblastos se ha dosificado con la ayuda de un kit ELISA (R&D Systems), según el protocolo preconizado por el fabricante. En paralelo, la cantidad de células vivas por pocillo se ha dosificado mediante un ensayo colorimétrico rojo neutro: la densidad óptica (DO), proporcional a la cantidad de células vivas, se lee a 570 nm. En paralelo, la cantidad de células vivas por pocillo se ha dosificado mediante un ensayo colorimétrico con MTT: la DO, proporcional a la cantidad de células vivas, se lee a 570 nm.

La cantidad de KGF se expresa por células vivas: pg/ml/DO570 MTT.

f. Estadísticas:

El significado de los resultados se ha evaluado mediante un ensayo t de Student.

5 Resultadosa. Expresión del heterotrímero $\alpha 3\beta 3\delta 2$ de la laminina 5

10 El control génico del proceso de re-epitelización implica varias familias de factores de transcripción o de crecimiento, en particular el TGF- $\beta 1$ que se libera a partir de los primeros instantes siguientes a una herida. En las condiciones fisiológicas de la re-epitelización, se ha demostrado que el TGF- $\beta 1$ estimulaba la expresión de la laminina-5. Este factor de crecimiento se utiliza como control positivo para estudiar la expresión génica de esta proteína, con el fin de acercarse a las condiciones fisiológicas.

15 El análisis cuantitativo de la cinética de expresión de los ARNm de las diferentes cadenas que comprenden la laminina 5 se ha realizado mediante PCR cuantitativa (Q-PCR) después de 48 horas de incubación con el TGF- $\beta 1$ a 5 ng/ml. Los resultados obtenidos indican una inducción muy significativa de la expresión de los 3 genes estudiados ($p < 0,01$), y con unos factores de inducción que alcanzan 12 para $\alpha 3$ y hasta 17 para $\gamma 2$ (tabla 10: A/B/C). El ARNm $\beta 3$ se ha inducido también a un nivel inferior, del orden de 5 veces.

20 Se ha estudiado la implicación potencial de los péptidos de quinoa en la regulación de la expresión de los 3 genes que componen la laminina 5. Los resultados obtenidos demuestran que los péptidos de quinoa estimulan de manera significativa y dosis-dependiente la expresión de estos genes, los factores de inducción alcanzan 3 para la cadena $\alpha 3$, 2 para la cadena $\beta 3$ y 2,6 para la cadena $\gamma 2$.

	Media dCt	Desviación típica	P	ddCt	QR	% de inducción
Control	1,435	0,659		0,00	1,00	
TGF β a 5 ng/ml	-0,944	0,664	$p < 0,01$	3,69	12,93	1193
Péptidos de Quinoa 0,05%	0,446	0,685	$p < 0,01$	1,49	2,82	182
Péptidos de Quinoa 0,1%	0,466	0,578	$p < 0,01$	1,64	3,12	212

Tabla 10A: Expresión génica de la cadena α -3 de la laminina 5

	Media dCt	Desviación típica	P	ddCt	QR	% de inducción
Control	1,435	0,659	0,00	1,00		
TGF β a 5 ng/ml	-0,944	0,664	$p < 0,01$	2,38	5,20	420
Péptidos de Quinoa 0,05%	0,446	0,685	$p < 0,01$	0,99	1,98	98
Péptidos de Quinoa 0,1%	0,466	0,578	$p < 0,01$	0,97	1,96	96

30 Tabla 10B: Expresión génica de la cadena β -3 de la laminina 5

	Media dCt	Desviación típica	P	ddCt	QR	% de inducción
Control	2,225	0,418		0,00	1,00	
TGF β a 5 ng/ml	-1,925	0,453	$p < 0,01$	4,15	17,76	1676
Péptidos de Quinoa 0,05%	1,502	0,489	$p < 0,01$	0,72	1,65	65
Péptidos de Quinoa 0,1%	0,839	0,336	$p < 0,01$	1,39	2,61	161

Tabla 10C: Expresión génica de la cadena γ -2 de la laminina 5

35 Tabla 10: Expresión génica de las 3 cadenas que componen la laminina 5.

b. Estudio de la expresión de la MMP-9

40 Entre las proteasas matriciales implicadas en la re-epitelización, la MMP-9 desempeña un papel particularmente importante. Está regulada positivamente por el TGF- $\beta 1$ y unas citoquinas pro-inflamatorias pero está expresada asimismo en el sitio de la herida por los queratinocitos migratorios.

45 Como se muestra en la tabla 11, el análisis de los resultados de Q-PCR ha permitido observar una inducción precoz de la expresión del gen de la MMP-9 en un factor de 8 después de 48 horas de estimulación por el TGF β . Utilizando este modelo, se ha demostrado asimismo el efecto de los péptidos de quinoa sobre la migración de los queratinocitos a través de su acción sobre la expresión del gen MMP-9. Así, los péptidos de quinoa estimulan significativamente la expresión de la MMP-9 de un factor de 2,6 con respecto al control sin tratamiento.

	Media dCt	Desviación típica	P	ddCt	QR	% de inducción
Control	6,08	0,84		0,00	1,00	
TGFβ a 5 ng/ml	3,07	0,55	p<0,01	3,01	8	807
Péptidos de Quinoa 0,05%	5,06	0,57	p<0,01	1,02	2	100
Péptidos de Quinoa 0,1%	4,68	0,74	p<0,01	1,4	2,63	163

Tabla 11: Estudio de la expresión génica de la MMP-9

c. Estudio de la producción de la proteína MMP-9

Después de haber estudiado el perfil de expresión génica de la MMP-9 en presencia de los péptidos de quinoa, se ha verificado que la inducción de la expresión del gen conduce asimismo a un aumento de la secreción de la proteína. Se ha evaluado por lo tanto la influencia de los péptidos de quinoa sobre la síntesis y la secreción de la MMP-9 por los queratinocitos, después de un tratamiento de 48 a 72 horas. Los resultados se presentan en la tabla 12. Así, los péptidos de quinoa aumentan significativamente la cantidad de MMP-9 segregada por unos queratinocitos (aumento que alcanza hasta el 55%).

	48H de tratamiento			72H de tratamiento		
	Cantidad MMP-9*	% A	Ensayo t de Student	Cantidad de MMP-9*	% A	Ensayo t de Student
Control	2,458			2,207		
TGFβ a 5 ng/ml	11,604	372	p<0,01	14,746	568	p<0,01
Péptidos de Quinoa 0,05%	2,799	14	p<0,01	3,429	55	p<0,01
Péptidos de Quinoa 0,1%	2,988	22	p<0,01	3,472	57	p<0,01

* ng/ml/DO rojo neutro; A = aumento

Tabla 12: Dosificación de la proteína MMP-9 en los sobrenadantes de los queratinocitos

d. Evaluación del efecto funcional de los péptidos de quinoa sobre la migración de los queratinocitos

Se ha evaluado el efecto funcional de los péptidos de quinoa sobre la migración de los queratinocitos en una cicatriz artificial después del bloqueo de la proliferación celular.

La comparación visual de las fotos que representan las células tratadas por los péptidos de quinoa con las células no tratadas permite concluir que los péptidos de quinoa favorecen la migración celular: presencia de más queratinocitos en la cicatriz artificial de las células tratadas por los péptidos de quinoa. Este aumento de la migración de los queratinocitos se ha cuantificado contando el número de células migratorias en la herida artificial. Así, los péptidos de quinoa aumentan en +67% la migración de los queratinocitos.

e. Efecto de los péptidos de quinoa sobre la proliferación de los queratinocitos

Con el fin de verificar si los péptidos de quinoa están asociados al proceso de proliferación de los queratinocitos (= segunda etapa del mecanismo de re-epitelización), se ha realizado un ensayo de viabilidad con MTT, para evaluar la acción directa de los péptidos de quinoa sobre la proliferación celular. Como se muestra en la tabla 13, el tratamiento con el ácido transretinoico (ATRA) = control positivo, induce un porcentaje de proliferación de +36%. De la misma manera, los péptidos de quinoa ensayados al 0,05 y 0,1% MS estimulan muy significativamente la proliferación de los queratinocitos, con un aumento del orden de +20%.

	Media D0570 (MTT)	Desviación típica	% de proliferación	Ensayo t de Student
Control negativo	1,003	0,050	100	
ATRA a 1 μM	1,361	0,140	136	p<0,01
Péptidos de Quinoa 0,05%	1,156	0,075	115	p<0,01
Péptidos de Quinoa 0,1%	1,201	0,071	120	p<0,01

Tabla 13: proliferación de los queratinocitos

f. Estudio de la síntesis de KGF por los fibroblastos

Durante la re-epitelización, el proceso de proliferación de los queratinocitos se efectúa bajo la influencia de numerosos factores que pueden ser segregados por los queratinocitos o por los fibroblastos de la dermis: producción de KGF (Keratinocyte growth Factor). En respuesta al KGF sobreexpresado por los fibroblastos, los queratinocitos se multiplican y recubren así más rápidamente la lesión. Se ha evaluado el efecto de los péptidos de quinoa sobre la secreción de este factor por los fibroblastos dérmicos, después de un tratamiento de 24 y 48 horas. En la tabla 14, se confirma que la síntesis de KGF aumenta en presencia de IL1α. Por otra parte, los péptidos de

quinoa ensayados al 0,05 y 0,1% MS estimulan de manera muy significativa la secreción de KGF por los fibroblastos. Esta estimulación es dosis-dependiente y muy importante a partir de 24 horas de tratamiento (multiplicación por 5 y 7 con respecto al control sin tratamiento).

	24H de tratamiento			48H de tratamiento		
	Cantidad de KGF*	% A	Ensayo t de Student	Cantidad de KGF*	% A	Ensayo t de Student
Control	27,853			80,884		
TGFβ a 5 ng/ml	147,886	431	p<0,01	352,387	336	p<0,01
Péptidos de Quinoa 0,05%	135,454	386	p<0,01	148,744	84	p<0,01
Péptidos de Quinoa 0,1%	194,650	599	p<0,01	160,405	98	p<0,01

* pg/ml/DO rojo neutro; A = aumento

Tabla 14: Dosificación de KGF en los sobrenadantes de fibroblastos.

Conclusión:

El conjunto de los estudios presentados en la presente memoria ha permitido demostrar el papel de los péptidos de quinoa en la cicatrización epidérmica. Estimulando los dos procesos, los péptidos de quinoa permiten una restauración eficaz y rápida de la integridad de la piel.

REIVINDICACIONES

1. Composición cosmética, dermatológica o nutracéutica que comprende un extracto lipídico de semillas de quinoa y, llegado el caso, un excipiente apropiado, caracterizada porque dicho extracto lipídico de quinoa es un insaponificable.

2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el extracto lipídico es un insaponificable, que tiene las especificaciones siguientes:

Contenido en tocoferoles (g/100 g)	1,5 - 3,5
Contenido en esteroides (g/100 g)	20,0 - 50,0
Contenido en escualeno (g/100 g)	20,0 - 50,0

3. Procedimiento de preparación de un insaponificable de quinoa, que comprende

- una etapa de preparación de un aceite de quinoa concentrado en su fracción insaponificable que comprende una etapa de destilación molecular de un aceite refinado de quinoa, y después
- una etapa de saponificación de dicho aceite de quinoa concentrado en su fracción insaponificable, y después
- una extracción de este insaponificable con la ayuda de un disolvente apropiado.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la etapa de destilación molecular se realiza utilizando un dispositivo seleccionado de entre los destiladores moleculares de tipo centrífugo y los dispositivos de tipo con película raspada.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o aceite refinado que tiene las especificaciones siguientes:

Corte graso (% en peso con respecto al peso total de aceite)	
C14	≤ 1,0
C16	5,0-12,0
C16'	≤ 1,0
C18	≤ 2,0
C18'	20,0 - 35,0
C18''	40,0 - 60,0
C18'''	2,0-13,0
C20	≤ 1,0
C20'	≤ 3,0
C22	≤ 1,0
C22'	≤ 3,0
C24	≤ 1,0
Contenido en tocoferoles (mg/100 g)	4 - 200
Contenido en esteroides (g/100 g)	0,5 - 3,0
Contenido en escualeno (g/100 g)	0,5 - 3,0
Contenido en insaponificable (g/100 g)	2,0 - 6,0

o aceite concentrado en su fracción insaponificable, que tiene las especificaciones siguientes:

Corte graso (% en peso con respecto al peso total del aceite)	
C14	≤ 1,0
C16	5,0 - 12,0
C16'	≤ 1,0
C18	≤ 2,0
C18'	20,0 - 35,0
C18''	40,0 - 60,0
C18'''	2,0 - 13,0
C20	≤ 1,0
C20'	≤ 3,0
C22	≤ 1,0
C22'	≤ 3,0
C24	≤ 1,0
Contenido en tocoferoles (mg/100 g)	40 - 5000

Corte graso (% en peso con respecto al peso total del aceite)	
Contenido en esteroides (g/100 g)	3,0 - 20,0
Contenido en escualeno (g/100 g)	2,0 - 40,0
Contenido en insaponificable (g/100 g)	5,0 - 50,0

para su utilización en la prevención y el tratamiento de las reacciones o patologías alérgicas, inflamatorias, irritativas de la piel y/o de las mucosas y/o de los faneros inmaduros, normales o maduros.

- 5 6. Composición que comprende un aceite concentrado en su fracción insaponificable, que tiene las especificaciones siguientes:

Corte graso (% en peso con respecto al peso total del aceite)	
C14	≤ 1,0
C16	5,0 - 12,0
C16'	≤ 1,0
C18	≤ 2,0
C18'	20,0 - 35,0
C18''	40,0 - 60,0
C18'''	2,0 - 13,0
C20	≤ 1,0
C20'	≤ 3,0
C22	≤ 1,0
C22'	≤ 3,0
C24	≤ 1,0
Contenido en tocoferoles (mg/100 g)	40 - 5000
Contenido en esteroides (g/100 g)	3,0 - 20,0
Contenido en escualeno (g/100 g)	2,0 - 40,0
Contenido en insaponificable (g/100 g)	5,0 - 50,0

y, llegado el caso, un excipiente apropiado para su utilización:

- 10
- en la prevención y/o el tratamiento de las heridas profundas,
 - para favorecer la cicatrización, o
 - en la prevención y/o el tratamiento de las atrofas subcutáneas de la dermis.
- 15 7. Método de tratamiento cosmético que pretende prevenir o tratar el envejecimiento cutáneo o de las estrías, caracterizado porque se utiliza una composición que comprende un aceite concentrado en su fracción insaponificable, que tiene las especificaciones siguientes:

Corte graso (% en peso con respecto al peso total del aceite)	
C14	≤ 1,0
C16	5,0 - 12,0
C16'	≤ 1,0
C18	≤ 2,0
C18'	20,0 - 35,0
C18''	40,0 - 60,0
C18'''	2,0 - 13,0
C20	≤ 1,0
C20'	≤ 3,0
C22	≤ 1,0
C22'	≤ 3,0
C24	≤ 1,0
Contenido en tocoferoles (mg/100 g)	40 - 5000
Contenido en esteroides (g/100 g)	3,0 - 20,0
Contenido en escualeno (g/100 g)	2,0 - 40,0
Contenido en insaponificable (g/100 g)	5,0 - 50,0

- 20 y, llegado el caso, un excipiente apropiado.

8. Composición que comprende un extracto peptídico y osídico de semillas de quinoa, susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- 25
- a) a partir de semillas de quinoa, extraer un aceite crudo y una torta, y recuperar dicha torta;
 - b) lavar dicha torta con agua o una mezcla hidroalcohólica para conservar sólo la parte proteica, y después

- c) solubilizar las proteínas;
- d) concentrar las proteínas y después hidrolizar dichas proteínas en péptidos;
- e) purificar y recuperar el extracto peptídico y osídico,

5 y, llegado el caso, un excipiente apropiado,

para su utilización:

- para favorecer la cicatrización;
- 10 - en la prevención y/o el tratamiento del acné;
- para regular los trastornos de la pigmentación; o
- en la prevención y/o el tratamiento de los hirsutismos o de las dermatitis seborreicas.

15 9. Composición según la reivindicación 8, caracterizada porque el extracto peptídico y osídico está constituido por 25 a 90% en peso de péptidos y por 10 a 50% en peso de azúcares, estando los porcentajes expresados en peso con respecto al peso total de dicho extracto peptídico y osídico.

20 10. Método de tratamiento cosmético de los faneros, en particular del cabello, del pelo o de las uñas, de la alopecia, de la caspa, o de las pieles normales, secas, grasas, mixtas, deshidratadas, envejecidas o sensibles, caracterizado porque consiste en administrar una composición que comprende un extracto peptídico y osídico de semillas de quinoa, susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- a) a partir de semillas de quinoa, extraer un aceite crudo y una torta, y recuperar dicha torta;
- b) lavar dicha torta con agua o una mezcla hidroalcohólica para conservar sólo la parte proteica, y después
- 25 c) solubilizar las proteínas;
- d) concentrar las proteínas y después hidrolizar dichas proteínas en péptidos;
- e) purificar y recuperar el extracto peptídico y osídico.

30 11. Método de tratamiento cosmético según la reivindicación 10, caracterizado porque el extracto peptídico y osídico está constituido por 25 a 90% en peso de péptidos y por 10 a 50% en peso de azúcares, estando los porcentajes expresados en peso con respecto al peso total de dicho extracto peptídico y osídico.

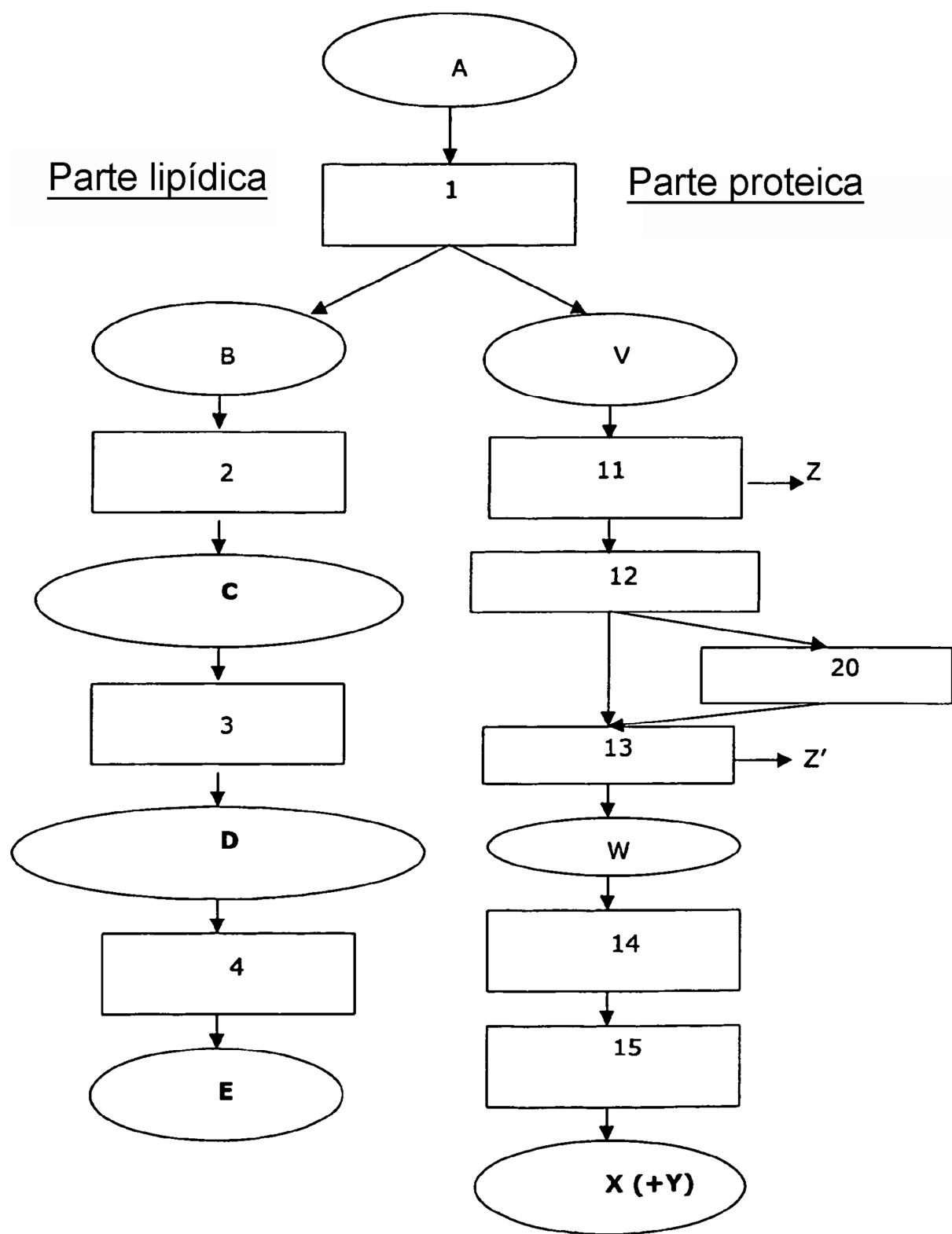


FIG. 1

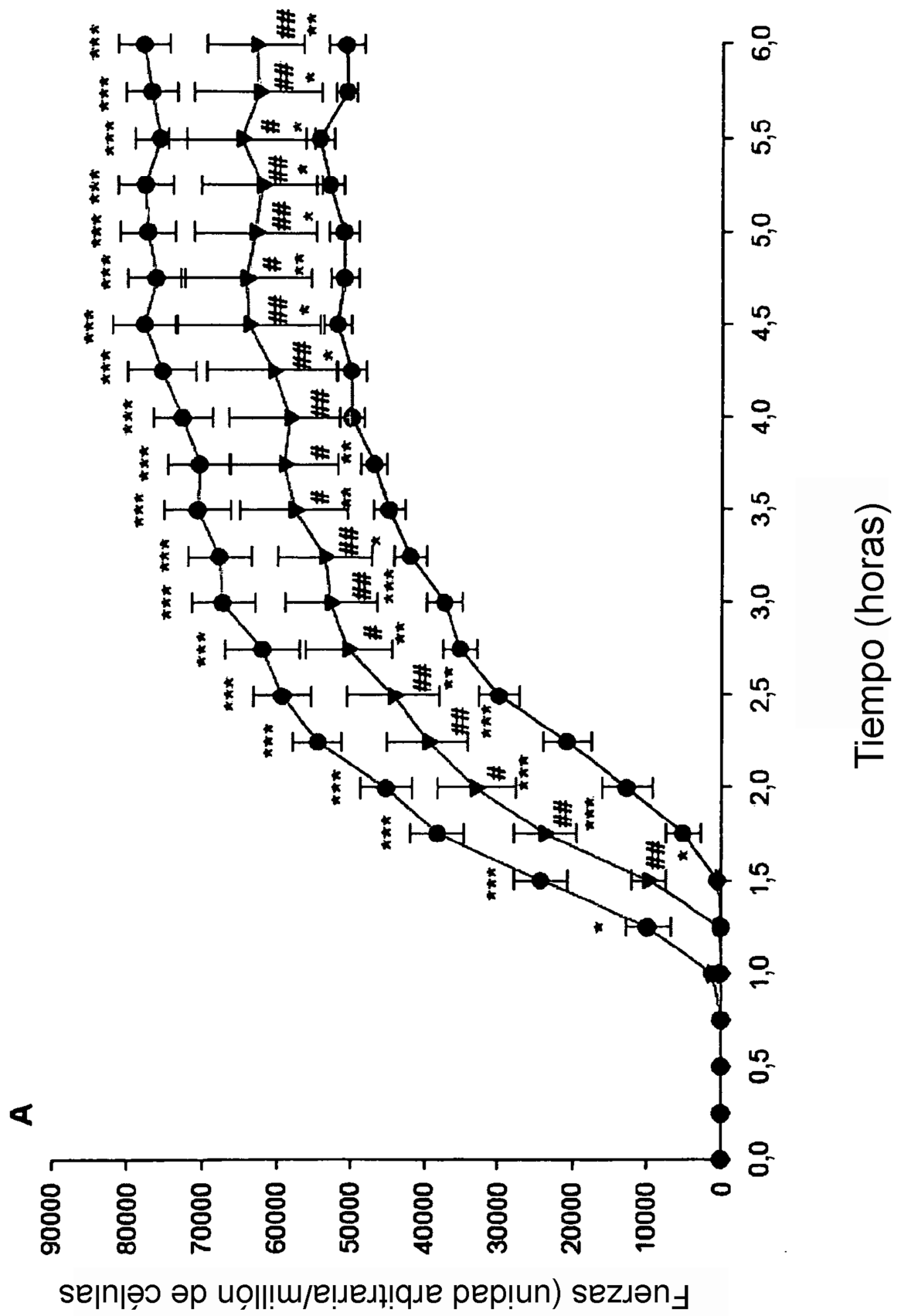


Figura 2A

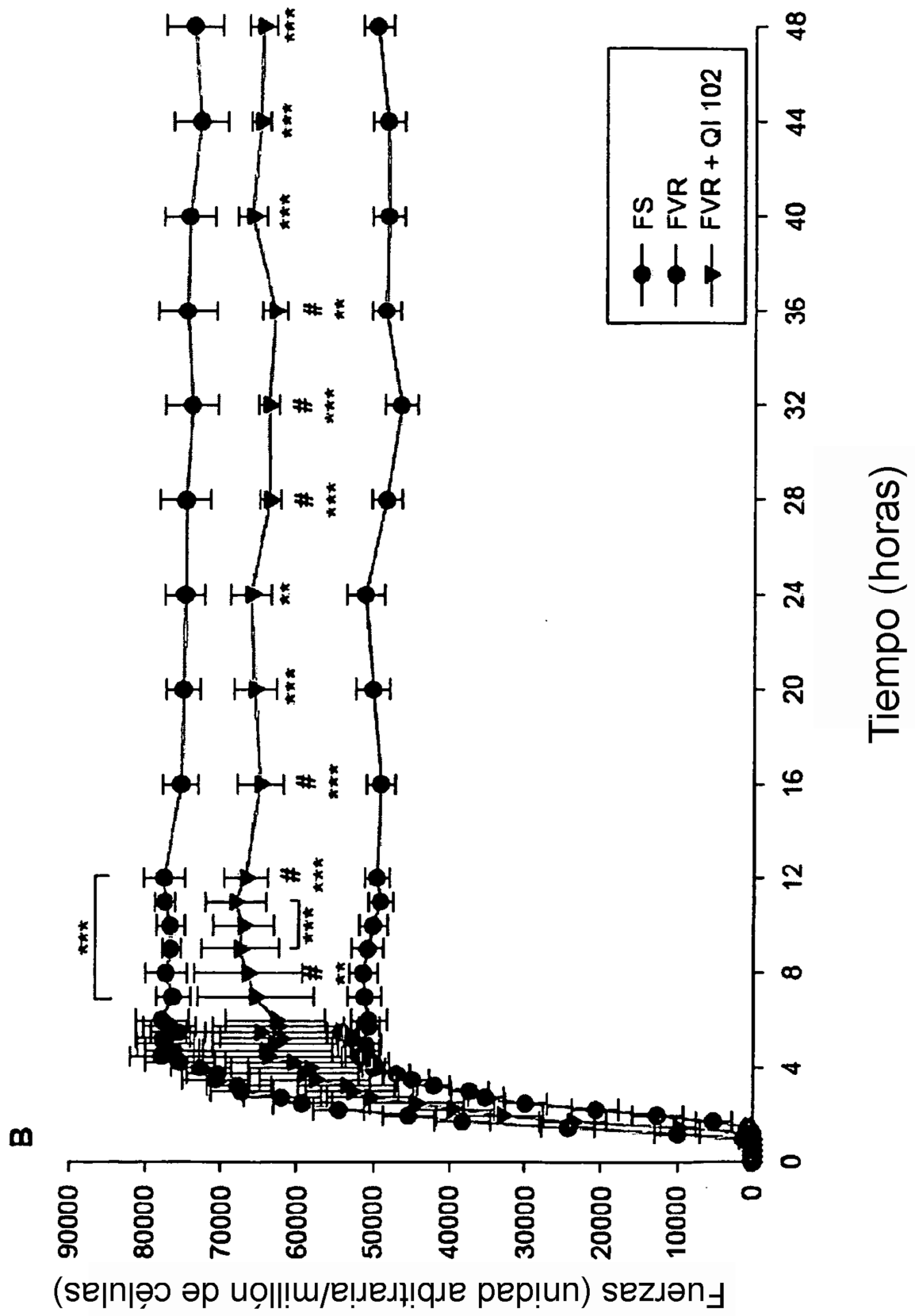


Figura 2B