

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 507**

51 Int. Cl.:

C07C 69/33 (2006.01)

C07D 311/62 (2006.01)

A61K 8/37 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 31/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2010 PCT/IB2010/000806**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11128714**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2010 E 10718689 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2558436**

54 Título: **Procedimiento para la fabricación de derivados de polifenoles estabilizados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2017

73 Titular/es:
**BERKEM S.A. (100.0%)
Marais Ouest
24680 Gardonne, FR**

72 Inventor/es:
**PERON, JEAN-LOUIS y
NKILIZA, JEAN**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 635 507 T3

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

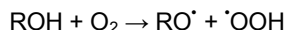
DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la fabricación de derivados de polifenoles estabilizados

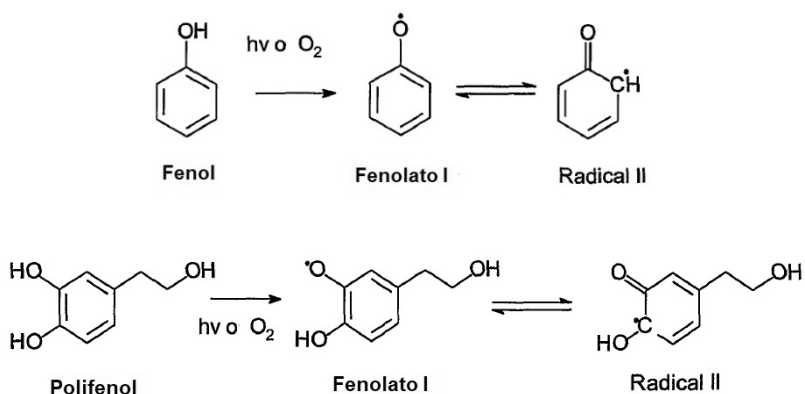
La presente invención se refiere a procedimientos para la producción de derivados estabilizados de polifenoles.

5 Se sabe por la bibliografía disponible que los compuestos fenólicos son inestables debido a la presencia de los grupos funcionales fenólicos que pueden oxidarse a través de varios reactivos presentes en el medio circundante, tal como oxígeno en aire, luz, luz notablemente ultravioleta y ciertos elementos metálicos, o pueden sencillamente ionizarse en medio básico.

El procedimiento de oxidación generalmente implica la creación de radicales libres como se representa en adelante:



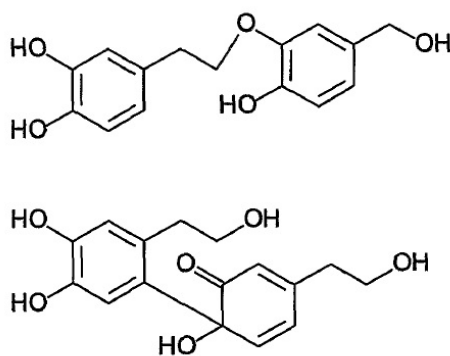
10 Este mecanismo es uno de escisión homolítica del enlace OH, que da lugar a radicales libres hidropéroxido (OOH) y alcóxido (RO).



Ejemplo de oxidación radical de polifenoles

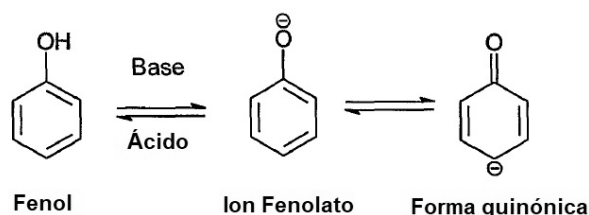
15 El radical fenolato (I) se estabiliza a través de resonancia para dar el radical (II).

Como estas especies radicales son altamente reactivas, pueden acoplarse consigo mismas en varias posiciones para llevar a una variedad de productos, unos pocos ejemplos de los cuales se dan en adelante.



20 Dicho mecanismo lleva a productos de condensación radical, y además de eso, derivados de quinonas que se forman cuando la condensación del anillo aromático es imposible.

La degradación de polifenol puede darse también como un resultado de cambio en el pH. En medio básico, la naturaleza ácida de los grupos funcionales fenólicos facilita los intercambios de protones a través de la escisión heterolítica del enlace OH. Esto lleva a la formación de un anión fenolato en equilibrio con el anión quinona.



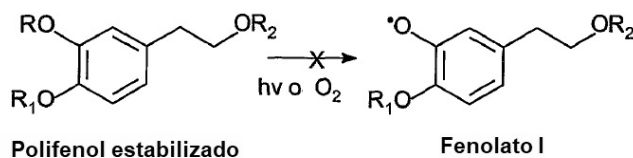
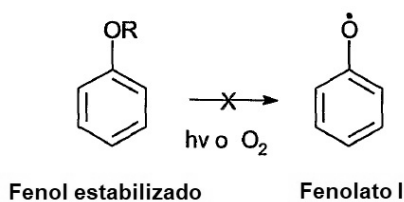
5 Donde están presentes las proantocianidinas en medio ácido, se da la despolimerización a través de la ruptura del enlace interflavónico, es decir, entre dos monómeros, llevando a un monómero y un catión donde inicialmente había un dímero. El catión puede oxidarse para dar antocianos o se estabilizará a si mismo mediante resonancia en la forma quinona.

Cuando está presente en medio básico, por ejemplo como un monómero de catequina, puede haber intercambio de protones, y la apertura anular del anillo piránico. Tanto el anión fenolato como la forma quinona experimentarán una reordenación del esqueleto para dar estructuras similares al ácido catequínico, por ejemplo, y/o una epimerización en el átomo de carbono C2, dando por resultado la conversión de la catequina a la epicatequina.

10 Así puede verse que la reactividad de polifenoles lleva a una variedad de derivados, la mayoría de los cuales están coloreados y de intensidad de color variable en el tiempo, y debido a su inestabilidad, son incompatibles con el uso en ciertas aplicaciones tales como formulaciones cosméticas.

15 Este tipo de degradación, especialmente la oxidación radical y reacciones en medio básico, se aumenta marcadamente cuando los grupos hidroxilo aromáticos (OH) están presente como grupos funcionales libres por su fuerte tendencia a intercambiar átomos de hidrógeno.

Cuando los grupos funcionales fenólicos se protegen, por ejemplo como ésteres o éteres, esta degradación se inhibe a todos los efectos:



En este esquema, R es diferente a H, por ejemplo un grupo acilo o alquilo, lineal o ramificado, saturado o insaturado.

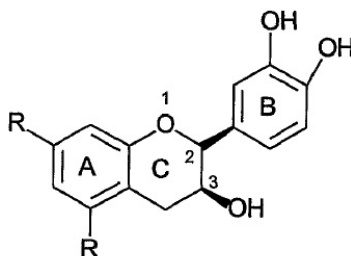
20 Otra desventaja de los grupos funcionales fenólicos libres es el aumento en la naturaleza hidrófila del compuesto, que es a menudo incompatible con ciertos excipientes usados en formulaciones cosméticas donde la naturaleza lipófila de las formulaciones es normalmente predominante. Aún de nuevo, la esterificación o eterificación de los grupos funcionales de hidroxilopolifenol libre, como se conoce en la técnica anterior, puede ser un desvío de este problema, como puede ser la microencapsulación.

25 La mayoría de polifenoles se conocen por tener características astringentes. Esta astringencia puede llevar a una sensación de sequedad en la boca cuando se usan los polifenoles en composiciones o formulaciones que se ingieren de forma oral o se aplican a las membranas mucosas, y como resultado estas formulaciones no se toleran o aceptan bien por el consumidor. Un artículo de LESSCHAEVE I. & al., publicado en *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 330S-335S, 2005, trata la naturaleza astringente de la mayoría de polifenoles, y el hecho de que en el caso de proantocianidinas, esta naturaleza astringente es un resultado de la afinidad del polifenol por las proteínas salivares.

30 La interacción entre los polifenoles y las proteínas están provocadas por varios factores, de los cuales unos dignos de mención son los enlaces de hidrógeno que se forman entre grupos hidroxilo fenólicos y los sitios nucleófilos, es decir, nitrógeno y azufre, de las proteínas. Esta complejación tiene una incidencia negativa en la absorción y

digestibilidad de macromoléculas tales como proteínas. De hecho, varios estudios han mostrado que esta propiedad es responsable de los efectos anti-nutricionales de los polifenoles en el hombre y los animales, cf. por ejemplo, Haslam E., *Plant polyphenols*, Cambridge university press, 1989; MEHANSHO, H. & al., *J. Biol. Chem.*, **260**, 4418-4423, 1985; MITJAVILA, S. & al., *J. Nutr.*, **107**, 2113-2121, 1977, CHANG M.J. & al., *J. Nutr.*, **124**, 283-288, 1994; AHMED A.E. & al., *Br. J. Nutr.*, **65**, 189-197, 1991. Otro efecto anti-nutricional tal es la unión o complejación de iones metálicos tales como hierro y cobre con polifenoles, que llevan a disponibilidad reducida de estos iones para la liberación en la célula.

Varios estudios han mostrado también que los polifenoles de catequina tienen propiedades antioxidantes notables. Según estos estudios, se ha descubierto una relación entre la estructura de polifenol y la actividad anti-radical. Los grupos hidroxilo fenólicos se consideran responsables de la actividad antioxidante. De hecho, la precondición aparente es la presencia o disponibilidad de dos grupos hidroxilo aromáticos libres en la posición orto en el anillo B (véase el esquema posterior del esqueleto de flavan-3-ol), que concede estabilidad aumentada al radical fenolato a través de la deslocalización de los electrones, o la estabilización a través de resonancia; aunque también la presencia de un doble enlace entre el átomo de carbono C2 y C3 conjugado con un grupo carbonilo en el átomo de carbono C4, dos grupos hidroxilo en la posición 3 y 5 del anillo A y un carbonilo en el átomo de carbono C4 del anillo C. Las moléculas que cumplen estos criterios se ha encontrado que son particularmente activas frente a los radicales. Sin embargo, la presencia de un doble enlace entre los átomos de carbono C2 y C3, por ejemplo como se encuentra en la rutina, y grupos hidroxilo no aromáticos, por ejemplo como se encuentra en el átomo de carbono 3, parecería que no tienen influencia significativa en las moléculas en todas las propiedades anti-radicales.



Esqueleto de flavan-3-ol

Para obtener actividad anti-radical, parecería así necesario tener al menos una función de grupo hidroxilo fenólico libre. Si el polifenol estuviera completamente esterificado, se asumiría de forma razonable que no habría actividad antioxidante residual debido al hecho de que el intercambio de protones se estimaría imposible. Por esta razón, las disoluciones de la técnica anterior previas han llevado a cabo siempre la incompleta protección de los grupos funcionales hidroxilo fenólico, dejando así algunos de estos grupos funcionales libres.

Un ejemplo tal se describe en el documento WO 2007144368 (LIBRAGEN). Esta solicitud de patente describe un procedimiento de glicosilación enzimática que permite la unión de un azúcar sencillo, es decir, glucosa, en un grupo hidroxilo no aromático, en este caso en el átomo de carbono 3. Sin embargo, la glicosilación se conoce por reforzar la naturaleza hidrófila del sustrato al que está unido, y así el derivado resultante no es adecuado para la cosmética sustancialmente lipófila o incluso preparados alimenticios. Ya que las funciones fenólicas permanecen libres, los derivados obtenidos por medio del procedimiento de esta solicitud de patente pueden oxidarse como cualquier otro fenol, y por lo tanto experimentará problemas de estabilidad en el tiempo. La misma clase de producto se describe en el documento US 2007184098 (COGNIS) y el documento EP 1950210 (POLARIS). Estas solicitudes de patente describen los procedimientos de esterificación catalizados por enzima lipasa y ácidos grasos. Como las enzimas descritas son muy específicas para sus sustratos, solo los grupos hidroxilo no aromáticos se esterifican. Se describen también resultados similares por PASSICOS E. & al., *Biotechnology Letters*, **26**, 1073-1076, 2004 y TORRES DE PINEDO, A. & al., *Tetrahedron*, **61**, 7654-7660, 2005.

Usando estas técnicas, las funciones fenólicas permanecen oxidables y también son responsables de la solubilidad de los compuestos en disolventes polares. Sin embargo, estos compuestos permanecen por la misma prueba pobremente lipófilos, y su inestabilidad en el tiempo los vuelve incompatibles con el uso en aplicaciones cosméticas o medios con base de lípido.

El documento US 20090215881 describe bioprecusores cosméticos y terapéuticos, en particular dermatológicos, que tienen la fórmula $[A]_n\text{-PP-[B]}_m$ en donde PP es un radical polifenol en que cada función hidroxilo está protegida por un grupo A o un grupo B, A es un radical alquilo saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, que tiene 1 a 20 átomos de carbono que se une al polifenol, n es un número entero no menor que 1, y B es un precursor de una molécula biológicamente activa, que está unida también al polifenol, y m es un número entero también no menor que 1.

El documento EP0698595 describe un procedimiento para la esterificación de un extracto polifenólico oligomérico de origen vegetal mediante un cloruro de ácido. El extracto se mezcla con un disolvente en que es insoluble para dar

una suspensión; al menos una amina terciaria alifática de bajo punto de ebullición se añade con una cantidad catalítica de al menos una base orgánica, no piridina; el cloruro de ácido graso se añade a esto, y se mezcla a una temperatura por debajo de 40°C después se concentra por evaporación para dar el extracto esterificado.

5 El documento FR2781675 describe un producto bioactivo de silicio y un bioflavonoide vegetal, en que el silicio está presente como un grupo SiOH biológicamente activo y/o un enlace –Si-O- que es hidrolizable en contacto con tejidos vivos para dar el grupo SiOH, y un enlace –Si-C- o Si-Si- no hidrolizable. La preparación del producto bioactivo por reacción de un halogenosilano, alcoxisilano o alquilsilano funcionalizado con un bioflavonoide en ausencia de agua, alcohol y luz y bajo atmósfera inerte, en presencia de una base orgánica de bajo punto de ebullición, se describe también.

10 La presente invención propone por lo tanto resolver los diversos problemas de la técnica anterior proporcionando un procedimiento para la fabricación de dichos polifenoles derivados, mientras se mantienen las propiedades deseables de los polifenoles no derivado originales en sí mismos, tales como su capacidad antioxidante, su acción beneficiosa en el colágeno, su acción beneficiosa en el sistema sanguíneo microcirculatorio, en GAGs (glicosaminoglicanos), y en los fibroblastos, por nombrar algunos.

15 Los polifenoles tienen grupos funcionales fenólicos, la totalidad de los cuales, es decir, 100%, están protegidos, o bien a través de esterificación o de eterificación, y como se determina por un espectro de absorción infrarrojo que muestra la ausencia de cualquier grupo hidroxilo libre.

Los polifenoles como se definen en las reivindicaciones se eligen de los siguientes grupos:

20 • Hidroxiestilbenos, tales como resveratroles monoméricos u oligoméricos, rapontina, desoxirapontina, piceatanol, y similares;

• Ácidos hidroxicinámicos, tales como ácido rosmarínico, ácidos clorogénicos, ácidos caféicos, ácidos ferúlicos;

• Fenoles sencillos y análogos, tales como hidroxitirosol, oleuropeina, verbascosida;

• Monómeros y oligómeros flavan-3-oles, tales como catequina, epicatequina, oligómeros de proantocianidina, galocatequinas, epigalocatequinas y similares;

25 • Flavonoles, dihidroflavonoles, flavononoles, isoflavonas;

• Hidroxichalconas y sus derivados, tales como aspalatina;

• Taninos hidrolizables tales como ácido tánico, nobotanina, potentilina, extracto de agalla y similares.

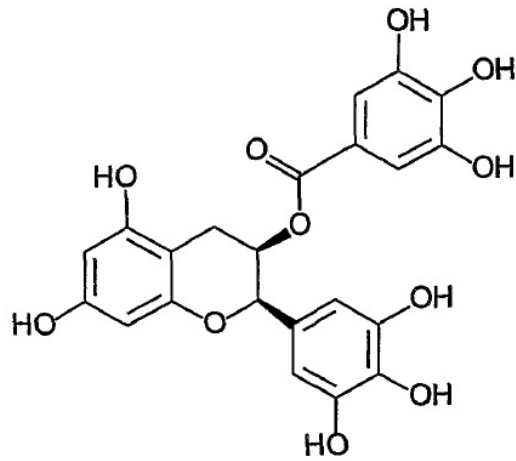
Preferiblemente, el polifenol es al menos uno de los siguientes:

30 - Una proantocianidina monomérica y/u oligomérica (OPC) encontrada en el grupo que consiste en extracto de té verde, extracto de semillas de uva, extracto de corteza de pino, extracto de potentilla y extracto de judía de cacao;

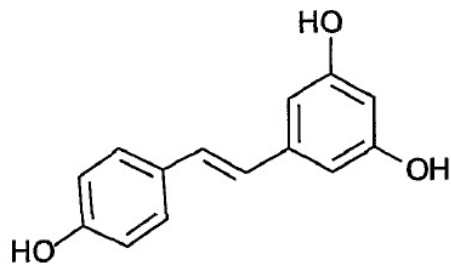
- Una chalcona encontrada en extracto de té rooibos no fermentado;

- Un hidroxiestilbeno en extracto de sarmiento de uva.

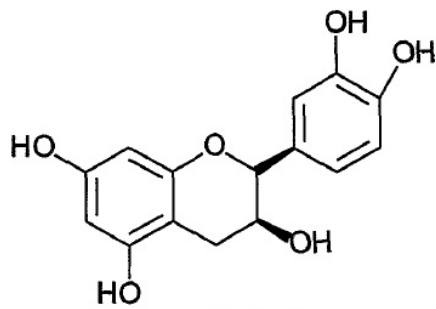
Incluso más preferiblemente, el polifenol se selecciona del grupo que consiste en:



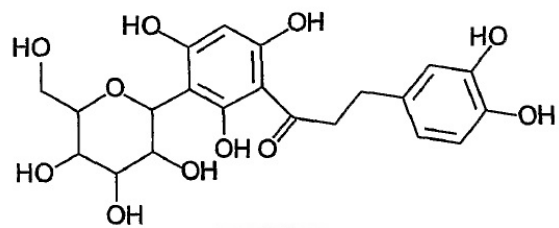
galato de epigalocatequina,



trans-resveratrol,



catequina, y

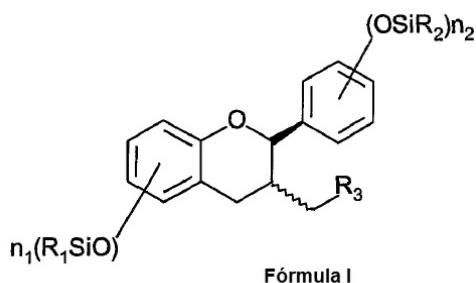


aspalatina.

Preferiblemente, el grupo éster se forma a partir de haluros de ácido graso saturados e insaturados que contienen 6-18 átomos de carbono. Haluros de ácido graso ejemplares preferidos en esta invención son cloruro de hexanoilo

(C6), cloruro de octanoilo (C8), cloruro de decanoilo (C10), cloruro de undecilenoilo (C11), cloruro de lauroilo (C12), cloruro de miristoilo (C14), cloruro de palmitoilo (C16) y cloruro de oleoilo (C18).

En otra realización preferida, el grupo éter se forma a partir de éteres de sililo como se define por las fórmulas I y II a continuación:



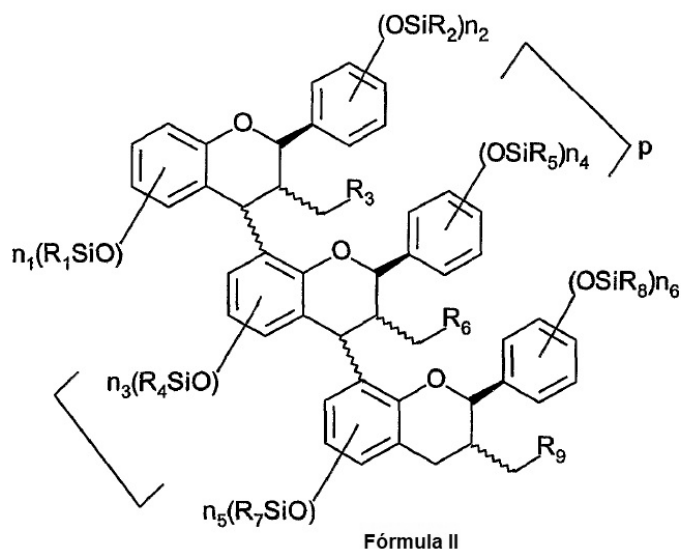
5

En que

- R₁ y R₂ son idénticos o diferentes, unidos al átomo de Si por enlaces no hidrolizables. Estos radicales que son hidrocarburos saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos, y cuando están sustituidos pueden contener uno o más grupos funcionales, tales como grupos alcoxi impedidos estéricamente. Los hidrocarburos pueden contener de entre 1 a 30 átomos de carbono;

- R₃ que es OH, H o un éter de sililo (OSiR), donde R es idéntico o diferente a R₁ y R₂ como se define anteriormente.

n₁ y n₂ son idénticos o diferentes, y tienen un valor de 0 a 3, que corresponden al número de sustituciones en un anillo; o



15 en que:

- n₁, n₂, n₃, n₄, n₅ y n₆ son idénticos o diferentes, teniendo un valor de 0 a 3 y correspondiendo al número de sustituciones en un anillo, además de sus isómeros.

- R₁, R₂, R₄, R₅, R₇, R₈ son idénticos o diferentes, y se unen al átomo de Si por medio de enlaces no hidrolizables. Son hidrocarburos saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos. Cuando son sustituidos, pueden contener varios grupos funcionales, tales como grupos alcoxi impedidos estéricamente. Los hidrocarburos pueden contener de 1 a 30 átomos de carbono;

- R₃, R₆ y R₉ son idénticos o diferentes, siendo OH, H, o un sililéter (OSiR), donde R es idéntico o diferentes a R₁ y R₂ como se define anteriormente;

- p es un número entero de 0 a 10.

Los compuestos obtenibles por el procedimiento de la presente invención se ha encontrado que son particularmente útiles en aplicaciones para prevenir o tratar varios efectos nefastos provocados por radicales libres, o glicación de proteínas de membrana, aunque también son útiles para la protección de la matriz extracelular cutánea. Dichos derivados de polifenol también se ha encontrado que reducen o incluso suprimen completamente las características notoriamente astringentes de otros derivados de polifenol conocidos hasta la fecha, que los ha hecho anteriormente difíciles o imposibles de usar en aplicaciones y formulaciones alimenticias y nutricionales de los seres humanos o animales.

Como se menciona anteriormente la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de polifenoles derivados. Se descubrió recientemente por los solicitantes que las condiciones de derivación usadas en el pasado no eran tan estables como se pensó primero a lo largo del tiempo. Factores normales implicados en la estabilidad de funciones éster están unidos básicamente a la presencia de residuos básicos o ácidos en el producto resultante, y/o el efecto de la temperatura que provoca que se de la hidrólisis y a partir de ahí la regeneración de los reactivos de partida. Las impurezas mencionadas aquí son normalmente el resultado de las condiciones de reacción iniciales, llevando así a la degradación de los productos de esterificación. Para determinar si este era el caso con productos anteriores hechos por el solicitante, palmitatos de OPC (proantocianidina oligomérica) de semilla de uva hechos según un procedimiento anterior diferente al procedimiento de la presente invención se analizaron durante el almacenaje. El solicitante se sorprendió de encontrar que a lo largo del tiempo los productos analizados presentaban un rápido aumento en cantidades de ácido palmítico residual, que en ciertos casos incluso excedieron las normas aceptables permitidas. La única explicación para este aumento era que los derivados de éster se hidrolizaban a lo largo del tiempo por puesta sencilla, no todos los residuos de hidroxilo fenólico se han esterificado durante el procedimiento de producción y se dejaban así la puerta abierta para problemas de inestabilidad.

Como el procedimiento de producción anterior no recurrió a ningún producto ácido, esta razón potencial para la reacción de hidrólisis se dejó de lado. La base original usada, trietilamina, se marcó usando cromatografía en fase gaseosa en varias cargas de palmitatos de OPC de semilla de uva. Se encontró que cantidades no desdeñables, hasta el 2,5%, estaban presentes. También se vio que la velocidad de degradación fue proporcional a la cantidad residual de trietilamina en los productos esterificados. Aunque se hicieron varios intentos para eliminar la trietilamina de las cargas, estos intentos no llevaron al resultado deseado.

El solicitante se enfrentó así con el problema de concebir un nuevo procedimiento de producción que satisficiera varios criterios:

- La base orgánica tendría que ser fácil de eliminar de la mezcla de reacción sin degradar el producto final, es decir, el polifenol esterificado o eterificado;

- el disolvente tendría que considerarse como no tóxico, lo que excluye los disolventes clorados conocidos normalmente considerados como carcinógenos, mutágenos o que tienen una influencia negativa en la reproducción humana o animal.

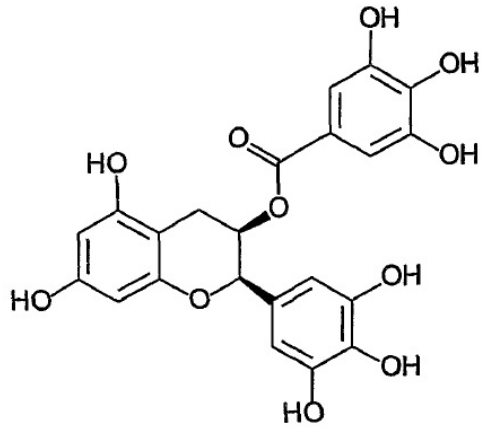
Por consiguiente, un objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de polifenoles derivados que comprenden provocar que un polifenol reaccione con un grupo funcional que forma un éster o que forma un éter en presencia de una base orgánica, en donde:

- El polifenol se elige de hidroxiestilbenos seleccionados del grupo que consiste en resveratroles monoméricos u oligoméricos, rapontina, desoxirapontina, piceatanol; ácidos hidroxicinnámicos seleccionados del grupo que consiste en ácido rosmarínico, ácidos clorogénicos, ácidos caféicos, ácidos ferúlicos; fenoles sencillos y análogos, seleccionados del grupo que consiste en hidroxitirosol, oleuropeina, verbascósido; monómeros y oligómeros de flavan-3-oles, seleccionados del grupo que consiste en catequina, epicatequina, oligómeros de proantocianidina, galocatequinas, epigalocatequinas, flavonoles, dihidroflavonoles, flavononoles e isoflavonas; hidroxichalconas y sus derivados, preferiblemente aspalatina; y taninos hidrolizables seleccionados del grupo que consiste en ácido tánico, nobotanina, potentillina, extracto de agalla y similares;

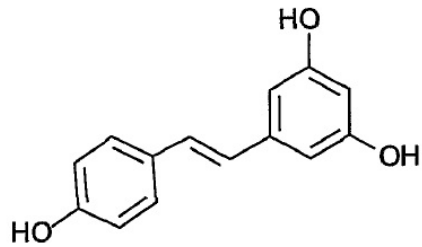
- La base orgánica se selecciona del grupo que consiste en derivados de imidazol solubles en agua, etanol y acetona en donde la base orgánica se elige del grupo que consiste en 1-metilimidazol, 2-metilimidazol, 4-metilimidazol, 2-etilimidazol, 1-etilimidazol, 1-propilimidazol y 1-isopropilimidazol, y

- La reacción se lleva a cabo en un disolvente aprótico.

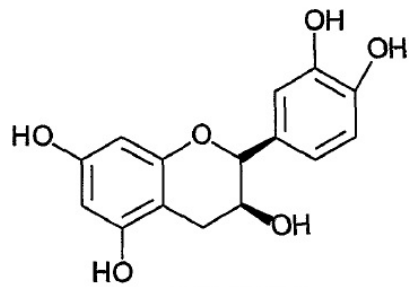
Incluso más preferiblemente, el polifenol se selecciona del grupo que consiste en:



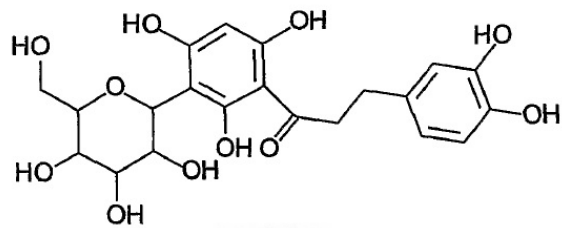
galato de epigalocatequina,



trans-resveratrol,



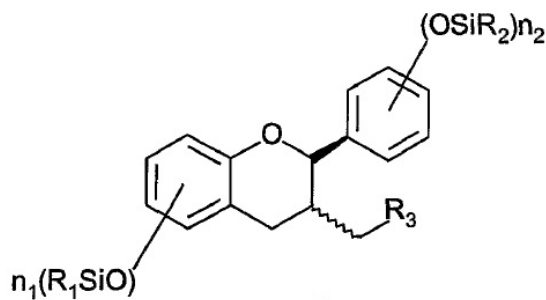
catequina, y



aspalatina.

Preferiblemente, el grupo que forma éster se origina de un haluro de ácido graso seleccionado del grupo que consiste en haluros de ácido graso saturado e insaturado que contiene 6-18 átomos de carbono.

- 5 En otra realización preferida, el grupo que forma éter se origina de sililéteres como se define por las fórmulas I y II a continuación:



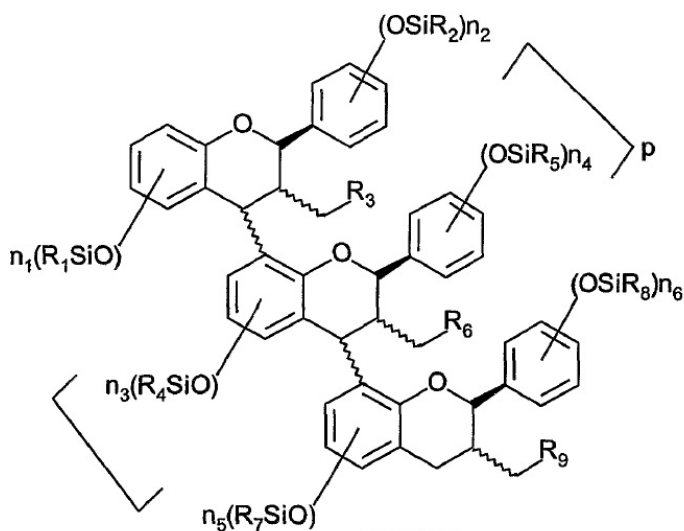
Fórmula I

En que

5 - R_1 y R_2 son idénticos o diferentes, unidos al átomo de Si por enlaces no hidrolizables. Estos radicales son hidrocarburos saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos, que contienen de entre 1 a 30 átomos de carbono, y cuando se sustituyen pueden contener uno o más grupos funcionales;

- R_3 es OH, H o un sililéter (OsiR), donde R es idéntico o diferente a R_1 y R_2 como se define anteriormente,

n_1 y n_2 son idénticos o diferentes, y tienen un valor de 0 a 3, que corresponde al número de sustituciones en un anillo; o



Fórmula II

10 en que:

- n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 y n_6 son idénticos o diferentes, teniendo un valor de 0 a 3 y que corresponde al número de sustituciones en un anillo, además de sus isómeros.

15 - $R_1, R_2, R_4, R_5, R_7, R_8$ son idénticos o diferentes, unidos al átomos de Si por medio de enlaces no hidrolizables, y son hidrocarburos saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos, que contienen, cuando están sustituidos, varios grupos funcionales, conteniendo los hidrocarburos de 1 a 30 átomos de carbono;

- R_3, R_6 y R_9 son idénticos o diferentes, y pueden ser OH, H o un sililéter (OsiR), donde R es idéntico o diferente a R_1 y R_2 como se define anteriormente;

- p es un número entero de 0 a 10.

Lo más preferiblemente, el grupo que forma un éter se origina a partir de terbutildimetilclorosilano.

20 El disolvente preferido usado en el procedimiento para producir los polifenoles derivados según la invención se selecciona del grupo de disolventes apróticos que consiste en acetona, acetato de etilo, acetato de isopropilo, metiletilcetona e isopropiléter.

La base preferida usada en el procedimiento para la producción de polifenoles derivados según la presente invención se eligió a partir de derivados de imidazol conocidos por tener buena solubilidad en agua, etanol y acetona, y en particular y más preferiblemente se eligió del grupo que consiste en 1-metilimidazol, 2-metilimidazol, 4-metilimidazol, 2-etilimidazol, 1-etilimidazol, 1-propilimidazol y 1-isopropilimidazol.

5 La presente invención se describirá ahora en más detalle, refiriéndose donde sea aplicable y apropiado a las Figuras de acompañamiento en que:

- La Figura 1 es una representación de la comparación de estabilidad en el tiempo entre un producto previo fabricado por el solicitante y los nuevos productos de polifenol derivado obtenidos por medio del procedimiento de la presente invención;

10 - La Figura 2 es un espectro de absorción infrarrojo de un derivado de éster de polifenol de semilla de uva según la invención;

- La Figura 3 es una traza de HPLC de polifenol de vástago de vid esterificado;

- La Figura 4 es un espectro de absorción infrarrojo de un polifenol de corteza de pino esterificado según la invención.

15 Si uno mira la Figura 1 identificada arriba, puede verse que en lugar de los productos anteriores, se encontró que los nuevos derivados de éster de polifenol de semilla de uva no contenían residuos de base orgánica y adicionalmente eran totalmente estables en el tiempo, hasta el grado que no podría detectarse una evolución significativa en las cantidades de ácido palmítico residual. En los siguientes ejemplos, aunque se usan extractos, que implican la presencia de uno o más fenoles activos, las cantidades molares de reactivos especificados se calculan en la
 20 asunción de que hay predominantemente solo una clase de fenol activo en el extracto, es decir, catequina para OPCs, galato de epigallocatequina para polifenoles de té verde, trans-resveratrol para hidroxiestilbenos presentes en vástago de vid, y aspalatina para las chalconas presentes en el extracto de té rooibos.

Ejemplo 1: Preparación de OPC de semilla de uva esterificada.

25 En un matraz de tres cuellos limpio y seco con un condensador y un embudo de adición, se disolvieron 10 g de OPC de semilla de uva, que representan 34,48 mmoles equivalentes de catequina, en 100 ml de acetona, bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió una cantidad catalítica, 0,6 g (5 mmoles equivalentes) de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) y 15 ml (188,41 mmoles equivalentes) de 1-metilimidazol. La mezcla se agitó a temperatura ambiente (20-25°C) durante aproximadamente 15 minutos. El embudo de adición se usó para añadir lentamente 50 ml (164,23 mmoles
 30 equivalentes) de cloruro de palmitoilo. La adición duró aproximadamente 30 minutos. La agitación se mantuvo bajo atmósfera de nitrógeno y temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas. La mezcla de reacción se concentró entonces a sequedad sin exceder una temperatura de 50°C.

El residuo seco se absorbió en 100 ml de etanol al 80%. La mezcla se calentó a 50°C durante aproximadamente una hora, y después se dejó caer a temperatura ambiente (20-25°C). El sobrenadante se eliminó y después el resto se lavó dos veces más usando el mismo procedimiento y condiciones.

35 El sólido lavado se disolvió entonces en 100 ml de acetona. La disolución de acetona caliente se vertió en 100 ml de etanol puro, y se agitó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C), después se filtró en vidrio sinterizado del número 4 que tenía una porosidad de 10 a 15 micras, y se secó al vacío sin calentamiento durante aproximadamente 12 horas. Se obtuvo un polvo beis que pesaba 30 g. El rendimiento de masa de la operación es 300%.

40 El análisis de cromatografía en fase gaseosa mostró que 1-metilimidazol estaba ausente y que el ácido palmítico estaba solo presente en una cantidad residual de 0,5%. El espectro infrarrojo correspondiente, como se ilustra en la Figura 2, no muestra bandas por encima de 3000 cm^{-1} que es el área característica de la absorción de grupos hidroxilo libres, y esto indica que la totalidad de los grupos OH funcionales están protegidos por el procedimiento de esterificación. Estos ésteres se muestran también en el espectro de la Figura 2, en las bandas características
 45 alrededor de 1760 cm^{-1} .

Ejemplo 2: Preparación de extracto de vástagos de vid esterificados

El procedimiento descrito anteriormente en el ejemplo 1 se aplicó a 4 g (17,54 mmoles equivalentes de *trans*-resveratrol) de extracto polifenólico obtenido de vástagos de vid. Se obtuvieron 13 g de producto estabilizado como un polvo coloreado de beis claro. El rendimiento en masa fue aproximadamente de 325%.

50 El análisis HPLC en fase normal, como se ilustra en la Figura 3, indicó que el producto contiene 46,6% de perpalmitato de *trans*-resveratrol y 34,6% de perpalmitato de épsilon-viniferina. La cromatografía de gases indicó un contenido en ácido palmítico residual de menos del 1% y la completa ausencia de 1-metilimidazol.

Ejemplo 3: Preparación de extracto de té rooibos (*Aspalathus linearis*)

Se añadieron 500 g de hojas no fermentadas y 2,5 litros de etanol al 50% en p/v en agua destilada a un matraz de reacción rodeado por un enfriador de agua y equipado con un agitador mecánico. La mezcla se calentó a reflujo durante una hora con agitación, y después se enfrió a temperatura ambiente (aproximadamente 20-25°C). La separación sólido-líquido se llevó a cabo por medio de filtración. Una segunda extracción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones.

Los dos filtrados hidroetanólicos se acumularon y se decoloraron con carbón activo para eliminar la clorofila. El filtrado claro se concentró a presión reducida sin exceder los 50°C hasta que todo el etanol se había eliminado. El concentrado acuoso, que podría contener aún cantidades traza de materia en suspensión se secó directamente por atomización o secado por pulverización. Aproximadamente 75 g de material seco se obtuvo como un polvo beis a marrón anaranjado. El rendimiento de extracción fue aproximadamente 15%. El producto obtenido absorbe luz UV con una absorción máxima a aproximadamente 280 nm. El contenido total de polifenol fue 32%.

Este extracto se usó para producir un derivado esterificado como se describe en el siguiente ejemplo.

Ejemplo 4: Preparación de extracto de té rooibos esterificado

El procedimiento descrito en el ejemplo 1 se aplicó a 15 g (34,48 mmoles equivalentes de aspalatina) del extracto preparado como anteriormente en el ejemplo 4. Se obtuvieron 31 g de polvo beis con una consistencia mantecosa. El rendimiento en masa fue aproximadamente 200%. Los derivados de extracto de té rooibos esterificado son solubles en disolventes apolares tales como hexano y absorben luz UV con una absorción máxima a 270 nm.

Ejemplo 5: Preparación de OPC de corteza de pino esterificada.

El procedimiento descrito en el ejemplo 1 se aplicó a 10 g (34,48 mmoles equivalentes de catequina) de OPC de corteza de pino, que se había obtenido según las enseñanzas del documento FR 2 092 743. Se obtuvieron 25 g de un polvo beis con una consistencia mantecosa. El rendimiento en masa fue aproximadamente 250%. La OPC de corteza de pino esterificada era soluble en disolventes apolares tales como hexano, y absorbe luz UV con una absorción máxima a 270 nm.

La cromatografía en fase gaseosa mostró que 1-metilimidazol estaba ausente y que la cantidad residual de palmítico fue 0,4%. El espectro infrarrojo de la Figura 4 no mostró bandas por encima de 3000 cm^{-1} donde los grupos hidroxilo libres están colocados de forma característica. Esto indicó que la totalidad, es decir, el 100% de los grupos OH estaban protegidas por esterificación. Una de las bandas características de los ésteres se muestra en el espectro a aproximadamente 1760 cm^{-1} .

Ejemplo 6: Preparación de OPC de potentilla esterificada

El procedimiento descrito en el ejemplo 1 se aplicó a 15 g (51,72 mmoles equivalentes de catequina) de extracto de OPC de rizoma de *P. tormentilla* obtenido según las enseñanzas de los documentos FR2749303 o US5928646. Aproximadamente 49 g de producto estabilizado se obtuvo como un polvo coloreado en beis claro. El rendimiento en masa fue aproximadamente 325%.

El análisis por cromatografía de gases mostró que 1-metilimidazol estaba completamente ausente y que el derivado contenía una cantidad residual de ácido palmítico del 2,5%. El espectro IR no mostró bandas más allá de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de los grupos hidroxilo libres. Todos los grupos OH se protegieron así por medio del procedimiento de esterificación, con una banda éster característica a 1760 cm^{-1} .

Ejemplo 7: Preparación de polifenoles de té verde esterificados.

El procedimiento del ejemplo 1 se aplicó a 10 g (21,83 mmoles equivalentes de galato de epigalocatequina) de extracto polifenólico de hojas de té verde obtenido según las enseñanzas del documento FR2734478. La base orgánica usada fue 1-etilimidazol. Aproximadamente 35 g de producto estabilizado se obtuvo como polvo beis claro. El rendimiento en masa fue aproximadamente 350%. La cromatografía de gases mostró que 1-etilimidazol estaba ausente y que había una cantidad residual de ácido palmítico del 2%. El espectro IR no mostró bandas por encima de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de grupos hidroxilo libres. Todos los grupos OH se protegieron así mediante el procedimiento de esterificación.

Ejemplos 8-13: Preparación de OPC de semilla de uva esterificada con derivados de ácidos grasos de cadena media (C6 a C14).

Los siguientes derivados se usaron para estabilizar los extractos polifenólicos: cloruro de hexanoilo (C6), cloruro de octanoilo (C8), cloruro de decanoilo (C10), cloruro de undecilenoilo (C11), cloruro de lauroilo (C12), cloruro de miristoilo (C14).

Las condiciones experimentales fueron las usadas en el ejemplo 1, con el extracto polifenólico siendo OPC de semilla de uva, y se hizo reaccionar con uno de los cloruros de ácido anteriores como agente acilante.

Ejemplo 8: Perhexanoato de OPC de semilla de uva.

5 Partiendo de 10 g (34,48 mmoles equivalentes de catequina) de OPC de semilla de uva, se obtuvieron 18 g de producto esterificado como un líquido marrón espeso. El análisis de cromatografía de gases mostró que 1-metilimidazol estaba ausente, y que solo el 0,1% de ácido hexanoico estaba presente. El espectro IR no mostró bandas más allá de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de los grupos OH libres y la presencia de bandas a 1760 cm^{-1} indicativas de ésteres.

Ejemplo 9: Peroctanoato de OPC de semilla de uva.

10 Partiendo de 10 g (34,48 mmoles equivalentes de catequina) de OPC de semilla de uva, fue posible obtener 23 g de producto esterificado como un líquido marrón espeso. El análisis de cromatografía de gases mostró que 1-metilimidazol estaba ausente, y que solo el 0,4% de ácido octanoico estaba presente. El espectro IR no mostró más allá de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de grupos OH libres y la presencia de bandas a 1760 cm^{-1} indicativas de ésteres.

Ejemplo 10: Perdecanoato de OPC de semilla de uva.

15 Con 10 g (34,48 mmoles equivalentes de catequina) de material de partida, fue posible obtener 25 g de producto esterificado como un líquido marrón espeso. El análisis de cromatografía de gases mostró que 1-metilimidazol estaba ausente, y que solo el 0,3% de ácido decanoico estaba presente. El espectro IR no mostró bandas más allá de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de grupos OH libres y la presencia de bandas a 1760 cm^{-1} indicativas de ésteres.

Ejemplo 11: Perundecilenato de OPC de semilla de uva.

20 Con 10 g (34,48 mmoles equivalentes de catequina) de material de partida, fue posible obtener 25 g de producto esterificado como un sólido marrón pastoso. El análisis de cromatografía de gases mostró que 1-metilimidazol estaba ausente, y que solo el 1% de ácido undecilénico estaba presente. El espectro IR no mostró bandas más allá de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de grupos OH libres y la presencia de bandas a 1760 cm^{-1} indicativos de ésteres.

Ejemplo 12: Perlaurato de OPC de semilla de uva.

25 Con 10 g (34,48 mmoles equivalentes de catequina) de material de partida, fue posible obtener 28 g de producto esterificado como sólido marrón pastoso. El análisis de cromatografía de gases mostró que 1-metilimidazol estaba ausente, y que solo 0,5% de ácido láurico estaba presente. El espectro IR no mostró bandas más allá de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de grupos OH libres y la presencia de bandas a 1760 cm^{-1} indicativa de ésteres.

Ejemplo 13: Permirstato de OPC de semilla de uva.

30 Con 10 g (34,48 mmoles equivalentes de catequina) de material de partida, fue posible obtener 23 g de producto esterificado como un sólido marrón pastoso. El análisis de cromatografía de gases mostró que 1-metilimidazol estaba ausente, y que solo el 0,5% de ácido mirístico estaba presente. El espectro IR no mostró bandas más allá de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de los grupos OH libres y la presencia de bandas a 1760 cm^{-1} indicativas de ésteres.

35 Ejemplo 14: Peroleato de OPC de semilla de uva.

40 Con 10 g (34,48 mmoles equivalentes de catequina) de material de partida, y bajo las mismas condiciones generales que en el ejemplo 1, con 2-etilimidazol como base orgánica y cloruro de oleoil como agente acilante, fue posible obtener 36 g de producto esterificado como un líquido marrón claro oleoso. La cromatografía de gases mostró que el 2-etilimidazol estaba ausente, y que el 3,5% de residuo de ácido oleico permaneció. El espectro IR no mostró bandas más allá de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de los grupos OH libres y la presencia de bandas a 1760 cm^{-1} indicativas de ésteres.

Ejemplo 15. Preparación de OPC de cacao esterificado

45 El procedimiento descrito en el ejemplo 1 se aplicó a 10 g (34,48 mmoles equivalentes de catequina) de OPC de cacao obtenida según las enseñanzas del documento FR 2 092 743. Aproximadamente 33 g de producto estabilizado se obtuvieron como un polvo beis claro. El rendimiento en masa fue aproximadamente 330%. La cromatografía de gases mostró la ausencia de 1-metilimidazol y una cantidad residual de ácido palmítico de 0,3%. El espectro IR no mostró bandas más allá de 3000 cm^{-1} que es la posición característica de grupos OH libres y la presencia de bandas a 1760 cm^{-1} indicativas de ésteres.

50 Ejemplo 16. Demostración de la actividad anti-lipoperoxidante de los derivados de polifenol obtenidos según el procedimiento de la invención en piel humana.

La naturaleza lipófila de los polifenoles estabilizados obtenidos según el procedimiento de la presente invención es relativamente alta en comparación con los polifenoles nativos. Se añade a esto su falta de afinidad por las proteínas, haciendo posible así considerar su aplicación tópica directamente en la piel para absorción transcutánea. De esta

5 forma, los productos estabilizados entran en contacto directo con las esterasas presentes en la piel. De la misma forma que con los lípidos, se dará una reacción hidrolítica que regenerará el polifenol y un residuo de ácido graso. Las propiedades biológicas ventajosas del polifenol así liberado pueden pasar a primer plano, por ejemplo como un antioxidante, anti-inflamatorio, antimicrobiano, agente antiglicación, protector vascular, modulador de hipocolesterolemia, agente anti-mitótico, etc.

Para demostrar este fenómeno, la actividad anti-radical de los polifenoles derivados estabilizados obtenidos según el procedimiento de la invención se estudió en explantes de piel humana tomada del área abdominal de una mujer de 40 años.

10 Los radicales libres oxigenados se producen en grandes cantidades en la piel como resultado de irradiación UV. Estas especies de radicales libres provocan varias formas de degradación a componentes celulares, y en particular, a lípidos de membrana. Los últimos se transforman en diversos derivados de hidroperóxido, tal como por ejemplo malonildialdehído (MDA) y 4-hidrononenal (4-HNE). La determinación de la cantidad de MDA en tejidos dérmicos es así un buen indicador de la producción de radicales libres oxigenados y peroxidación de lípidos de membrana. Una comparación de los niveles de MDA entre sujetos tratados y no tratados indica por lo tanto si el producto aplicado
15 tiene actividad anti-lipoperoxidante.

Condiciones experimentales:

El modelo usado para los experimentos es uno de explantes de piel humana que se mantienen en modo supervivencia a 37°C, una atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

Los explantes dérmicos se dividen en tres

- 20
- Carga de control no tratada
 - Carga de control positiva tratado con vitamina E (2 mg por explante)
 - Carga tratada con productos según la invención.

25 Los productos a ensayar se disuelven a una concentración de 2% de aceite de vaselina. Esta disolución se aplica de forma tópica a los explantes dérmicos a una velocidad de una aplicación de 30 micro-litros por explante por día durante 5 días.

En el día 5 los explantes se irradian con luz UV A y UV B 2 horas después de la aplicación de los productos a ensayar.

Los niveles de MDA (expresados en pmoles de MDA/ml de medio) en los explantes se miden para las cargas tanto tratadas como no tratadas.

30 La tabla posterior muestra la reducción en porcentaje en MDA de explantes tratados en comparación con explantes no tratados.

Nombre del producto	% de reducción en MDA
Éster palmítico de extracto de té rooibos	13
Éster de undecilenato de OPC de semilla de uva	23
Éster palmítico de OPC de semilla de uva	24
Éster palmítico de OPC de corteza de pino	26
Éster palmítico de OPC de potentilla	38
Éster palmítico de extracto de té verde	45
Vitamina E	11

35 Este estudio muestra que los polifenoles estabilizados obtenidos según el procedimiento de la invención presentan actividad anti-lipoperoxidante significativa. Todos los ésteres se realizan mejor con el control con vitamina E, que es una referencia de antioxidante conocida y respetada en aplicaciones de cosmética.

Como la actividad anti-radical se une a la presencia de grupos hidroxilo fenólicos libres, los resultados también muestran que los polifenoles estabilizados obtenidos según el procedimiento de la presente invención han pasado la barrera cutánea y a partir de ahí se han hidrolizado por esterasas, liberando así los grupos hidroxilo fenólicos que se protegieron inicialmente como ésteres. Otra interesante consecuencia de lo anterior es que los derivados de éster

pueden por lo tanto usarse también como vectores para los polifenoles, y para aumentar su biodisponibilidad en el cuerpo.

Ejemplos 17 a 20. Demostración de la protección de los componentes de matriz cutánea extracelular.

5 En la piel, la matriz extracelular está constituida por macromoléculas que son de tipo proteína o tipo glicano en su naturaleza. Generalmente, 4 categorías principales de macromoléculas pueden considerarse: los colágenos, la elastina, los proteoglicanos (conocidos de otra forma como glicosaminoglicanos) y las glicoproteínas estructurales (lamininas, fibrilinas, fibronectina, etc.).

10 El papel del colágeno es proporcionar resistencia mecánica a los tejidos cutáneos, la elastina es responsable de su elasticidad, los glicosaminoglicanos se ocupan de la hidratación, y las glicoproteínas estructurales son responsables del establecimiento y cohesión del tejido.

Mientras uno envejece, la velocidad a la que la mayoría de estos elementos macromoleculares de la matriz extracelular se sustituyen disminuye bruscamente. Así la piel pierde su firmeza, y su elasticidad y manifestaciones desagradables de las mismas aparecen, tal como arrugas. Estimulando la síntesis de estas macromoléculas de la matriz extracelular cutánea, se hace posible mantener la piel en su estado normal.

15 Los productos obtenidos según el procedimiento de la presente invención se han ensayado por lo tanto ex vivo para ver si tendrían alguna actividad en la matriz extracelular. Los ensayos se llevaron a cabo en explantes de piel humana que se mantuvieron en un estado viable.

Preparación del explante

20 Los explantes de diámetro aproximado de 10 mm se prepararon a partir de una muestra abdominal tomada de una mujer de 46 años. Los explantes se mantuvieron vivos a 37°C en atmósfera húmeda, enriquecida con 5% de CO₂.

Aplicación del producto

25 Para cada producto derivado a ensayar, se prepararon 3 concentraciones en aceite de vaselina a concentraciones de 0,5, 0,25 y 0,1% respectivamente. Los productos a ensayar se aplicaron de forma tópica a una dosis de 30 µL por explante, o un disco de papel de filtro, en los días 0, 2, 3 y 6. Los explantes de control no recibieron ningún tratamiento.

Muestreo

En el día 0, los 3 explantes de la carga T0 se muestrearon y se prepararon en formol tamponado.

30 En el día 8, los explantes de cada carga se muestrearon y se manejaron de la misma forma. La inmunotinción y coloreado específico de los explantes se llevó a cabo entonces. Se observó actividad morfológicamente a través del microscopio óptico y usando análisis de imágenes.

Ejemplo 17: Acción de ésteres de OPC de potentilla y ésteres de OPC de corteza de pino en colágeno I

El éster de OPC de potentilla, a una concentración de 0,5% indujo un aumento del 12% en el colágeno I en la dermis papilar.

35 El éster de OPC de corteza de pino, a una concentración de 0,5%, indujo un aumento del 20% del colágeno I en la dermis papilar.

Ejemplo 18: Acción de los ésteres de OPC de potentilla y ésteres de OPC de corteza de pino en el colágeno III

El éster de OPC de potentilla a concentraciones de 0,5 y 0,1% respectivamente indujo un aumento respectivo del 33% y 38% en el colágeno III en la dermis papilar.

40 El éster de OPC de corteza de pino a una concentración de 0,5 y 0,1% respectivamente indujo un aumento respectivo en el colágeno III en la dermis papilar de 21 y 30%.

Ejemplo 19: Acción de OPC de potentilla esterificada y polifenoles de té verde esterificados en colágeno IV

El extracto de té verde esterificado a concentraciones de 0,25 y 0,1% respectivamente indujo un aumento de 40% y 18% en el colágeno IV en la unión epidérmica-dérmica.

45 La OPC de potentilla esterificada a una concentración de 0,1% indujo un aumento de 26% en el colágeno IV en la unión epidérmica-dérmica.

Ejemplo 20: Acción de los polifenoles de té verde esterificados en fibrilina-1

Los polifenoles de té verde esterificados a concentraciones de 0,5 y 0,25% indujeron un aumento respectivo de 21 y 13% en fibrilina-1 en la unión epidérmica-dérmica.

El envejecimiento es un procedimiento complejo bien documentado en la bibliografía, y vinculado a varios factores, de los cuales, además de factores genéticos, pueden mencionarse los siguientes: los factores medioambientales tales como radicales libres oxigenados, caídas en los niveles de ciertas hormonas, polución, consumo de tabaco y alcohol, luz UV del sol, etc. La luz del sol, por ejemplo, estimula la producción de metaloproteinasas de matriz, también conocidas como MMP. Estas son enzimas que rompen la matriz extracelular de los tejidos conjuntivos, especialmente en la piel. Hay varios tipos conocidos, uno de los cuales es colagenasa intersticial, también conocida como MMP1, que rompe el colágeno. Otras que pueden mencionarse son estromelina o MMP3, que rompe la elastina, gelatinasa o MMP2, que principalmente rompe el colágeno tipo I. Se sabe así que la exposición a la luz del sol provoca un cambio en la fabricación de las fibras de colágeno y elastina, llevando a una pérdida de tono y elasticidad en la piel que provoca las arrugas. Otros efectos nocivos del componente UV de la luz solar se conocen también, tales como una caída en la inmunidad, cambios en la melanogénesis, la producción de radicales libres oxigenados, y algunas formas de cáncer de piel. El uso de polifenoles para ayudar a combatir los efectos de la exposición al sol se han descrito también porque los polifenoles pueden actuar como un agente anti-radical filtrando la radiación absorbida, en donde los polifenoles capturan o inhiben la iniciación o propagación de radicales libres, aunque también juegan un papel en la inhibición enzimática, y como se ha mostrado anteriormente, en la estimulación de la síntesis de colágeno y elastina.

Los radicales libres oxigenados son especies altamente reactivas, que están presentes a lo largo de las vidas de animales y seres humanos, y también participan en la función normal del organismo, como por ejemplo en el sistema respiratorio. Se forman continuamente en un organismo sano, lo más notablemente en la mitocondria. Esta producción está equilibrada generalmente por su absorción por antioxidantes endógenos, mediante enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, el equilibrio se altera y se crea una situación conocida como estrés oxidativo. Dicho estrés puede estar provocado por muchos agentes, que incluyen luz UV, contaminantes del aire tales como NO y NO₂, disolventes orgánicos, pesticidas, hiperoxemia, etc. Este estrés oxidativo se conoce por estar implicado en un número de patologías, entre las que se pueden mencionar patologías neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedades cardiovasculares tales como isquemia, trastornos mitóticos que llevan a la aparición de tumores y otras malformaciones, envejecimiento celular, ruptura oxidativa de macromoléculas, acumulación de intermedios internos y tóxicos que dan por resultado la oxidación de lípidos insaturados y peroxidación de lípidos de membrana, etc.

El mecanismo por el cual estos radicales, que normalmente dan por resultado una reacción en cadena, se forman, es como sigue:

Iniciación (I): $RH \rightarrow R^{\cdot}$

La etapa de iniciación puede catalizarse mediante varios factores, por ejemplo luz UV.

Propagación (II):

$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$

$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$

Terminación (III):

$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow \text{Producto inerte (dismutación)}$

$R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow \text{Producto inerte (dismutación)}$

$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow \text{Producto inerte}$

En organismos aeróbicos tales como animales y seres humanos, los radicales libres son esencialmente radicales oxigenados que llevan a la peroxidación de componentes celulares tales como los azúcares, lípidos, proteínas y ADN, y que dan lugar a productos altamente inestables. El procedimiento de formación de radicales se auto-mantiene hasta que un producto final estable se consigue como se indica anteriormente o cuando una esponja de radicales libres captura el radical en la etapa de iniciación o propagación.

Los resultados de la presente invención muestran que los polifenoles derivados de la presente invención retienen todas las propiedades beneficiosas asociadas con los polifenoles originales, no modificados, y así pueden usarse por ejemplo en formulaciones cosméticas previstas para evitar o reparar los efectos del envejecimiento cutáneo.

Otras causas de envejecimiento celular, particularmente en relación con la piel pueden encontrarse en lo que se conoce como productos finales de glicación avanzada. Estos productos son el resultado de la reacción espontánea, es decir, sin la necesidad de enzimas, entre glucosa y moléculas tales como colágeno y elastina. Estos productos finales son más resistentes a la proteólisis y así disminuyen la renovación de los componentes de la matriz

5 extracelular. Adicionalmente, estos productos finales inducen la reticulación entre fibras de colágeno, haciéndolas menos solubles e interrumpiendo su organización en la matriz. El desequilibrio total provocado lleva a la pérdida de tono y elasticidad en la dermis, y es uno de los factores responsables de la aparición de arrugas. Como los polifenoles derivados de la presente invención cruzan la barrera transcutánea, y la forma activa se recrea mediante la acción de esterasas, pueden usarse para tratar los efectos del envejecimiento provocado por las reacciones de glicación mencionadas anteriormente.

Ejemplo 21: Demostración de actividad anti-lipoperoxidante de polifenoles eterificados obtenidos según el procedimiento de la invención en piel humana.

10 La actividad anti-radical se determinó usando el mismo método descrito en el ejemplo 17. Se usó una OPC eterificada (sililéter) similar a la descrita en el documento FR2781675, y que corresponde a las fórmulas I y II posteriores:

Los resultados obtenidos con este producto derivado según la invención fueron como sigue:

Nombre del producto	% de reducción en MDA
OPC de semilla de uva silileterificada	11
Vitamina E	11

15 Como puede verse por los resultados anteriores, la actividad del producto obtenido según el procedimiento de la invención fue el mismo que para la vitamina E, la referencia estándar en este campo. Esto muestra también que los enlaces eterificados pueden hidrolizarse para regenerar el polifenol necesario y adicionalmente, silanol. Este estudio también demuestra que los polifenol sililéteres obtenidos según el procedimiento de la presente invención, notablemente los monómeros u oligómeros de flavan-3-ol pueden usarse en formulaciones cosméticas, con la ventaja adicional de combinar los beneficios de los polifenoles con silicio. Durante la hidrólisis, el átomo de silicio forma un silanol, que se conoce por ser una de las formas biológicamente activas de silicio in vivo.

Ejemplo 22: Análisis citotóxico de polifenoles derivados

25 Este ensayo implica determinar la viabilidad de células a través de reacción calorimétrica con sal de tetrazolio (MTT). El grupo tetrazolio, que inicialmente muestra un color amarillo se reduce para formar un grupo formazano que muestra un color azul violeta, por medio de la acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial presente en las células vivas activas. El color del medio cambia así del amarillo al azul violeta. La intensidad de color medida por densidad óptica a 540 nm es proporcional al número de células vivas y metabólicamente activas. Este estudio se llevó a cabo en explantes dérmicos obtenidos a partir de biopsias abdominales. Los explantes se cortan en fragmentos de diámetro de 8 mm y se mantienen vivos a 37°C. Los productos a estudiar se disuelven en aceite de vaselina y la disolución aplicada de forma tópica a una dosis de 5 mg de disolución por centímetro cuadrado de explante. Las concentraciones usadas oscilan de 0,02 a 5%. Los ensayos se llevan a cabo por triplicado y el tiempo de contacto del producto con los explantes es 24 horas.

Los explantes se escinden en 3 grupos:

- Grupo de control no tratado
- Grupo de control tratado con aceite de vaselina solo
- 35 • Grupo tratado con producto de la invención

Algunos de los resultados obtenidos se dan a continuación:

Tratamiento	Densidad óptica (540 nm)	% de viabilidad
Control no tratado	0,531	100%
Control tratado con vaselina	0,515	97%
Éster palmítico de OPC de semilla de uva al 2%	0,703	132%
OPC de semilla de uva undecilenada al 5%	0,664	125%
OPC de semilla de uva de sililéter al 5%	0,659	124%

- Estos resultados indican que los productos probados no tienen citotoxicidad en comparación con los grupos no tratados. Este hecho soporta el uso de los polifenoles derivados obtenidos según el procedimiento de la invención en muchas aplicaciones, que incluyen, aunque no están limitadas a, aplicaciones farmacéuticas, aplicaciones cosméticas y aplicaciones alimentarias para la nutrición de seres humanos y animales. Como los polifenoles derivados obtenidos según el procedimiento de la invención tienden a tener características lipófilas pronunciadas, y no forman más complejos con proteínas, se facilita su absorción a través del tracto gastrointestinal. Una vez absorbidos, se hidrolizarán mediante las esterases y otras enzimas presentes. Los productos hidrolizados, es decir, los polifenoles, ácidos grasos o silanoles estarán así disponibles para ejercer su influencia y numerosas propiedades ventajosas.
- 5
- 10 Los polifenoles derivados obtenidos según el procedimiento de la presente invención pueden usarse así en cualquier forma adecuada, tal como comprimidos, cápsulas de gel, cremas, emulsiones, máscaras faciales, lociones, lavados, geles o incluso en disolución. Los excipientes que pueden asociarse con ellos serán dependientes de la formulación que se desea crear. Por ejemplo, para comprimidos, se consideraría usar almidón, laurilsulfato sódico, estearato de magnesio, lactosa, celulosa microcristalina, sílice coloidal, estearilfumarato sódico, manitol, goma arábiga, talco y/o
- 15 cera de abeja como apropiados. Para cápsulas de gel, los excipientes de recubrimiento de la cápsula podrían ser gelatina y dióxidos de silicón. En cuanto a cremas, geles y lociones, los excipientes serían normalmente los conocidos para aplicaciones externas, por ejemplo sílice coloidal, hidróxido sódico, agua desmineralizada, carbopol, alcohol cetílico, alcohol de estearilo, butilenglicol, estearato de glicerol, glicerina, goma arábiga, goma de xantano, miristato de isopropilo, isononanoato de isononilo, triglicéridos caprílico/cáprico, ciclometicona, dimeticona, etc.
- 20 Los siguientes ejemplos no limitativos adicionales de formulaciones están encerrados. Las cantidades indicadas son peso/peso y las formulaciones se preparan según las prácticas de formulación cosmética normal.

Crema anti-edad

Estearato de glicerilo	2,50
Octildodecanol	3,00
Triglicérido caprílico/cáprico	3,0
Isononanoato de cetearilo	2,0
Dimeticona	3,00
Ésteres PEG-20 de tribehenina	3,0
Éster de OPC de semilla de uva de la invención	0,7
Aceite de argán	3,0
Escualeno	3,0
Goma de xantano	0,25
Glicerina	4,0
Fenoxietanol; caprililglicol; clorfenesina	0,7
Perfume	0,1
Agua desionizada	CSP

Formulación reestructurante y protectora del pelo

Alcohol de cetearilo y Cetareth-20	10
Octildodecanol	2
OPC de semilla de uva de sililéter según la invención	0,7
Cocamida DEA	1
Agua osmotizada	CSP
Glicerina	6

ES 2 635 507 T3

Cloruro de cetrimonio	0,5
Fenoxietanol, caprililglicol	0,9
Perfume	0,2

Formulación de champú anti-caspa

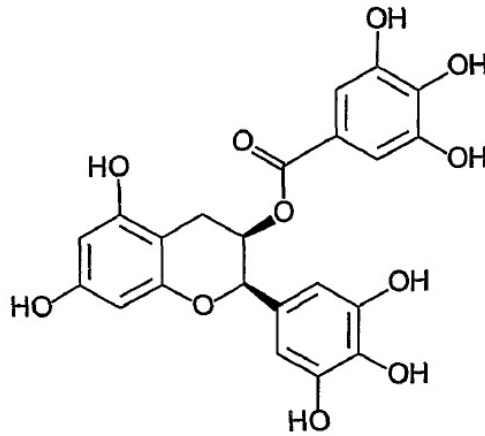
Copolímero entrecruzado de acrilatos/acrilato de alquilo C10-30	1,2
Propilenglicol	6,0
Hidróxido sódico	0,4
Laurethsulfato sódico	30,0
PEG-6 glicéridos caprílico/cáprico	3
OPC de semilla de uva undecilenada de la invención	0,7
Cocamidopropilbetaína	5,0
Hidantoína de DMDM, yodopropilbutilcarbamato	0,1
Agua desionizada	CSP

Crema anti-oxidante y filtro solar

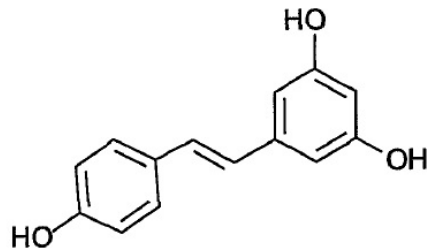
PEG-30 Dipolihidroxiestearato	1,0
Isohexadecano	6,0
Éster de OPC de semilla de uva de la invención	0,5
Alquilbenzoato C12-15, óxido de titanio, ácido polihidroxiesteárico, estearato de aluminio, alúmina	10,0
Sulfato de magnesio	1,0
Butilenglicol	4,5
Ciclopentasiloxano	2,0
Diazolidinilurea; butilcarbamato de yodopropinilo	0,6
Agua desionizada	CSP

REIVINDICACIONES

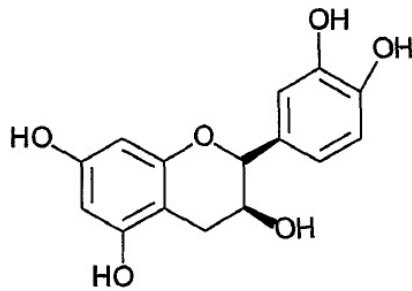
1. El procedimiento para la preparación de polifenoles derivados que comprende provocar que un polifenol reaccione con un grupo funcional que forma éster o que forma éter en presencia de una base orgánica, en donde:
- El polifenol se elige de:
- 5 - Hidroxiestilbenos seleccionados del grupo que consiste en resveratroles monoméricos u oligoméricos, rapontina, desoxirapontina y piceatanol;
- Ácidos hidroxicinnámicos seleccionados del grupo que consiste en ácido rosmarínico, ácidos clorogénicos, ácidos caféicos y ácidos ferúlicos;
- Fenoles simples y análogos seleccionados del grupo que consiste en hidroxitirosol, oleuropeina y verbascosida;
- 10 - Monómeros y oligómeros de flavan-3-ol seleccionados del grupo que consiste en catequina, epicatequina, oligómeros de proantocianidina, galocatequinas y epigalocatequinas;
- Flavonoles, dihidroflavonoles, flavononoles e isoflavonas;
- Hidroxichalconas y sus derivados, preferiblemente aspalatina; y
- 15 - Taninos hidrolizables seleccionados del grupo que consiste en ácido tánico, nobotanina, potentilina y extracto de agalla;
- La base orgánica se selecciona del grupo que consiste en derivados de imidazol solubles en agua, etanol y acetona en donde la base orgánica se elige del grupo que consiste en 1-metilimidazol, 2-metilimidazol, 4-metilimidazol, 2-etilimidazol, 1-etilimidazol, 1-propilimidazol y 1-isopropilimidazol; y
- La reacción se lleva a cabo en un disolvente aprótico.
- 20 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde el disolvente aprótico se elige del grupo que consiste en acetona, acetato de etilo, acetato de isopropilo, metiletilcetona e isopropiléter.
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones del procedimiento anteriores, en donde el polifenol es al menos uno de los siguientes:
- 25 — Una proantocianidina monomérica y/u oligomérica (OPC) encontrada en el grupo que consiste en extracto de té verde, extracto de semillas de uva, extracto de corteza de pino, extracto de potentilla, y extracto de judía de cacao;
- Una chalcona encontrada en el extracto de té rooibos no fermentado;
- Un hidroxiestilbeno encontrado en el extracto de vástago de vid.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones del procedimiento anteriores, en donde el polifenol se selecciona del grupo que consiste en:



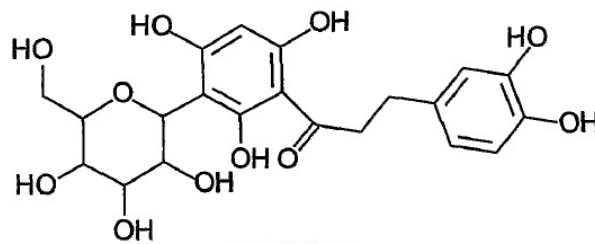
galato de epigalocatequina,



trans-resveratrol,



catequina, y

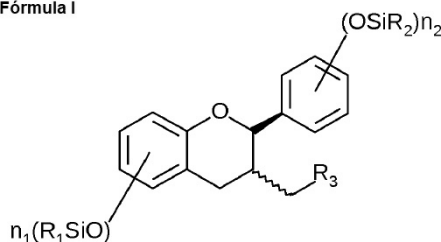


aspalatina.

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones del procedimiento anteriores, en donde el grupo que forma ésteres se origina de un haluro de ácido graso seleccionado del grupo que consiste en haluros de ácido graso saturado e insaturado que contienen 6-18 átomos de carbono.

6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el grupo que forma éter se origina de sililéteres como se define por las Fórmulas I y II a continuación:

Fórmula I

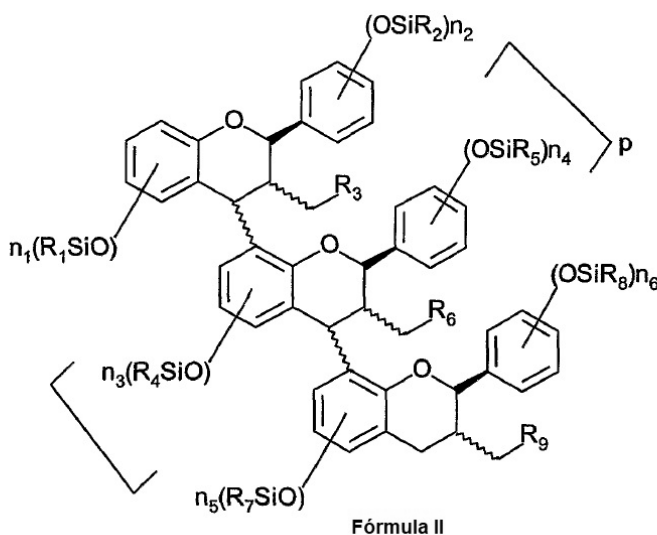


En que

5 - R_1 y R_2 son idénticos o diferentes, unidos al átomo de Si por enlaces no hidrolizables, siendo estos radicales hidrocarburos saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos que contienen de entre 1 a 30 átomos de carbono, y cuando están sustituidos contienen uno o más grupos funcionales;

- R_3 es OH, H o un sililéter (OSiR), donde R es idéntico o diferente a R_1 y R_2 como se define anteriormente.

10 n_1 y n_2 son idénticos o diferentes, y tienen el valor de 0 a 3, que corresponde al número de sustituciones en un anillo; o



Fórmula II

en que:

- n_1 , n_2 , n_3 , n_4 , n_5 y n_6 son idénticos o diferentes, teniendo un valor de 0 a 3 y que corresponde al número de sustituciones en un anillo;

15 - R_1 , R_2 , R_4 , R_5 , R_7 , R_8 son idénticos o diferentes, unido al átomo de Si por medio de enlaces no hidrolizables, y son hidrocarburos saturados o insaturados, sustituidos o no sustituidos, que contienen, cuando se sustituyen, varios grupos funcionales, conteniendo los hidrocarburos de 1 a 30 átomos de carbono;

- R_3 , R_6 y R_9 son idénticos o diferentes, preferiblemente OH, H o un sililéter (OSiR), donde R es idéntico o diferente a R_1 y R_2 como se define anteriormente;

20 - p es un número entero de 0 a 10.

7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de procedimiento anteriores en donde el grupo que forma éter se origina a partir de tercbutildimetilclorosilano.

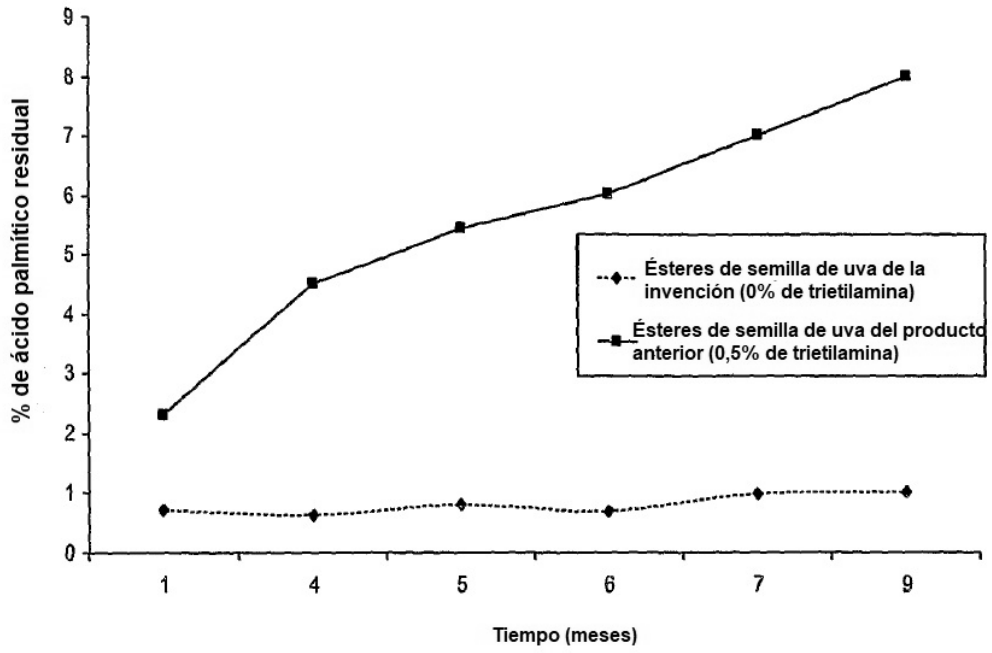


Fig. 1

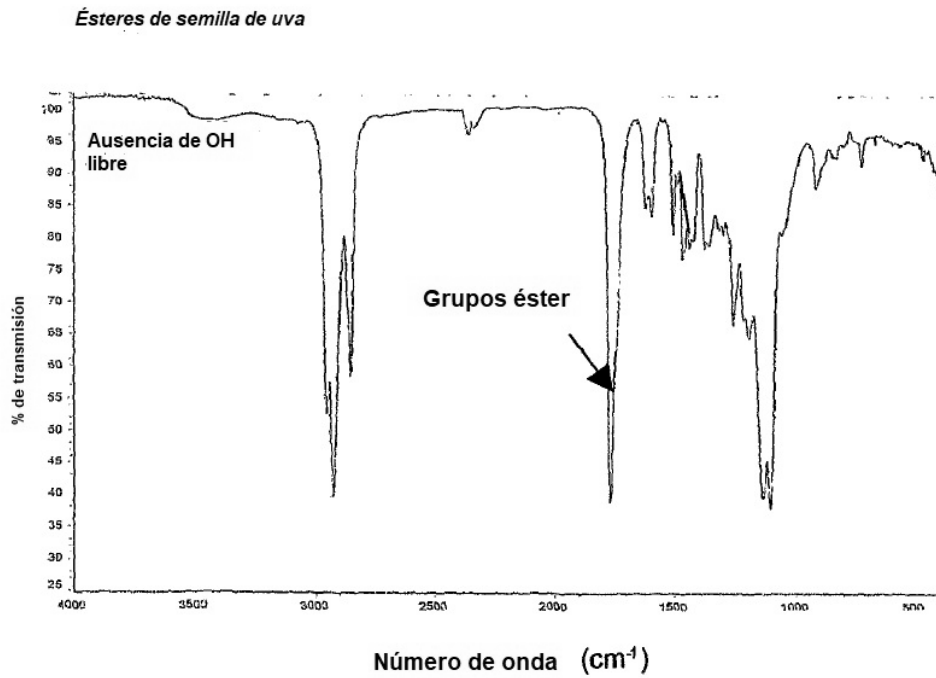


Fig. 2

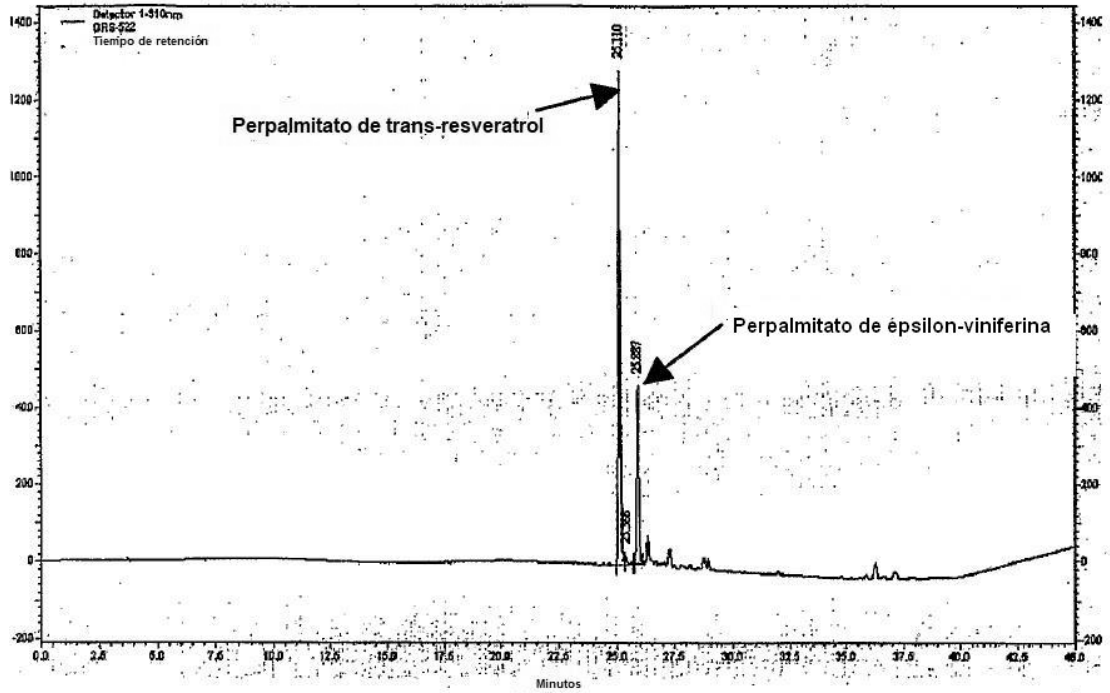


Fig. 3

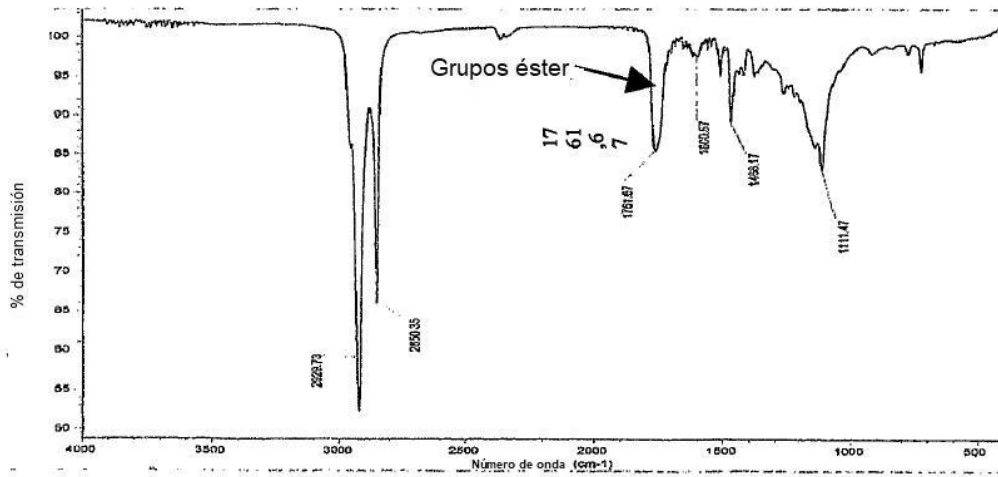


Fig. 4