

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 562**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2007.01)
A61Q 1/02 (2006.01)
A61Q 1/06 (2006.01)
A61Q 5/12 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/FI2013/051030**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068190**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13792719 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2914242**

54 Título: **Composiciones cosméticas que contienen fracciones de extractos de arándano rojo**

30 Prioridad:

01.11.2012 FI 20126144

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2018

73 Titular/es:

**LUMENE OY (100.0%)
 Lasikuja 2
 02780 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**BACKMAN, JOSEFIN;
 ISOHANNI, TIINA;
 JAAKKOLA, MARI;
 MALINEN, HANNA-LIISA;
 MÄKI, MARIANNE;
 RÄTY, JARKKO y
 VIRTANEN, VESA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 655 562 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

Composiciones cosméticas que contienen fracciones de extractos de arándano rojo

Campo de la invención

5 En la presente invención se explotan corrientes secundarias de la industria de bayas, especialmente la torta de prensa obtenida cuando se prensa zumo de arándano rojo. De forma específica, la parte fibrosa seca de la torta de prensa, es decir, polvo de fibra de arándano rojo, se usa como materia prima para producir ingredientes que son útiles en composiciones cosméticas.

Antecedentes de la invención

10 Las bayas han tenido en papel importante en la dieta humana durante décadas y hoy en día también sus efectos sobre la salud se han reconocido ampliamente. Los efectos sobre la salud están relacionados a menudo con los compuestos fenólicos encontrados en abundancia en las bayas. Muchos compuestos fenólicos son antioxidantes bien conocidos pero también protegen las bayas de los peligros de su medio ambiente, por ejemplo, del exceso de radiación UV del sol o de los ataques de virus, bacterias u hongos. También los colores de las bayas están influidos por las combinaciones de diferentes compuestos fenólicos en cada especie de baya. Estos compuestos están de este modo localizados sobre todo en las capas de la piel de las bayas.

15 La producción de zumo de bayas es una práctica común de utilizar bayas a una escala industrial. El zumo se prensa de bayas y las pieles y las semillas se quedan en el residuo de prensa, que también se llama torta de prensa. La torta de prensa es altamente perecedera como tal pero el secado extiende su utilidad y vida útil. Ha sido un gran desafío para la industria de las bayas encontrar un uso provechoso para esta corriente secundaria, que puede formar hasta 30% del peso original de las bayas. Las semillas se usan hasta cierto punto para hacer aceites de semilla de baya, y las pieles de baya fibrosas como polvo de fibra de baya se usa en aplicaciones alimentarias. Todavía queda mucho residuo de prensa y por consiguiente cantidades significativas de compuestos fenólicos de bayas sin utilizar. Se necesitan nuevos medios para procesar y nuevas aplicaciones para utilizar este valioso material.

20 Algunos compuestos fenólicos, por ejemplo, quercetina y kaempferol, son ingredientes químicamente fabricados y comúnmente usados en el acondicionamiento de la piel. Sin embargo, una tendencia común es hacia el uso de ingredientes naturales en productos cosméticos. Por lo tanto, la industria de cosméticos busca constantemente nuevos ingredientes seguros de origen vegetal. Además, estos ingredientes se deben producir rentablemente con un procesamiento mínimo y simple y deben mantener su actividad en los productos finales.

30 La quercetina tiene muchas características ventajosas, por ejemplo, propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. La quercetina se clasifica como un flavonol por estructura. Todos los flavonoles tienen en común una cadena principal de 3-hidroxiflavona, que puede llevar grupos OH fenólico adicionales en varias posiciones. Estos compuestos así como los compuestos fenólicos en general están presentes en muchas frutas, bayas y vegetales y aparecen sobre todo como glucósidos conjugados, es decir, unidos a varias moléculas de azúcar.

35 Los arándanos rojos (*Vaccinium vitis-idaea*) se sabe que contienen, por ejemplo, glucósidos de quercetina y kaempferol entre otros compuestos fenólicos. La abundancia de glucósidos de kaempferol es significativamente menor que la de los glucósidos de quercetina (Ek et al., 2006 y USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.0, 2011).

40 La composición fenólica de arándanos rojos ha sido ampliamente estudiada pero todavía no está caracterizada completamente. Se sabe que las cantidades de diferentes compuestos varían según muchos factores, tales como el medio de cultivo. Las estructuras conjugadas también provocan un reto adicional para el análisis. Las principales clases de compuestos fenólicos que se encuentran en los arándanos rojos son ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas, flavonoles, flavan-3-oles y proantocianidinas, como se revisó recientemente por Kylli (2011).

45 En la bibliografía de patentes, varias solicitudes de patente describen métodos para extraer, aislar y enriquecer compuestos fenólicos a partir de material vegetal, por ejemplo, bayas. Por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. N° 2005/175762 describe la extracción de antioxidantes lipófilos de arándano tales como quercetina, isoquercitrina, ácido cinámico, antocianina o proantocianidina usando fraccionamiento en columna de resina con un sistema disolvente agua/etanol/metanol/acetona o partición en clorormo:metanol:agua de polvo de zumo de arándano. Los compuestos fenólicos se extraen de torta de prensa de arándanos por medio de acetona acuosa. El extracto resultante se extrae adicionalmente con varios disolventes orgánicos, por ejemplo, butanol, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo o éter. La fase orgánica de varias extracciones se evapora y los extractos restantes se liofilizan. Dichos métodos, como la mayoría de los métodos conocidos usan disolventes orgánicos nocivos.

55 La Patente de EE.UU. N° 7.208.181 describe un método para aislar compuestos polifenólicos de frutas y bayas. El método se basa en la extracción con agua subcrítica (SWE) en lugar de la extracción con disolvente orgánico. En la SWE, sin embargo, los requisitos de instrumentación y los costes de producción subsecuentes son elevados.

La solicitud de patente de EE.UU. No. 2009/011056 se centra en producir un extracto enriquecido en antocianina, proantocianina y resveratrol del fruto del arándano rojo. Los extractos se obtienen extrayendo el mismo lote de arándanos rojos dos veces. La primera extracción se realiza usando alcohol, alcohol acuoso, agua, ácido acuoso, disolución acuosa que contiene enzima o disolución acuosa de ácido y alcohol. El extracto se concentra y purifica y el primer residuo de extracción se vuelve a extraer con acetato de etilo, benceno, tolueno, cloroformo, diclorometano, n-hexano, acetona, metanol, etanol, o una de sus mezclas, o disolución acuosa de metanol o etanol o disolución acuosa que contiene enzimas celulasa o pectasa. Este segundo extracto también se concentra y purifica. Los compuestos finales de arándano rojo se obtienen mezclando el primer y el segundo extracto concentrado y purificado en diferentes proporciones.

La solicitud de patente de EE.UU. No. 2010/297272 también describe métodos, en los que se obtienen composiciones de arándano rojo ricas en antocianidina, procianidina y resveratrol. Se mezclan dos extractos hechos de frutos de arándano rojo, pero los disolventes usados y los detalles de las etapas de purificación difieren de los usados en el documento US 2009/011056. Los métodos en ambas aplicaciones, como otros muchos métodos de fraccionamiento conocidos para compuestos fenólicos, incluyen etapas de purificación en las que, por ejemplo, se usan purificaciones en columna con resinas químicas o técnicas de filtración de membrana. Estos tipos de métodos de purificación o el uso de disolventes acuosos en general conducen a la necesidad de adicionales etapas de secado que consumen tiempo que incrementan adicionalmente los costes de producción.

En general, se conoce en la técnica la explotación de tortas de prensa de arándano rojo y otras bayas como fuente de compuestos fenólicos, estando centrado el interés comercial principalmente en obtener extractos ricos en antocianinas y proantocianidinas. Existe una necesidad constante de encontrar fuentes vegetales, a partir de las cuales se podrían aislar fácilmente compuestos fenólicos, y desarrollar nuevos métodos para enriquecer los compuestos activos más apropiados de dichas fuentes para usar en aplicaciones específicas. La presente invención muestra una opción para preparar extractos ricos en quercetina de origen de bayas naturales (específicamente arándano rojo) para aplicaciones cosméticas.

25 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones cosméticas activas que contienen ciertas fracciones de extractos de arándano rojo (*Vaccinium vitis-idaea*) obtenidas a partir de la torta de prensa de arándano rojo, específicamente de su parte fibrosa seca (polvo de fibra de arándano rojo). La invención también se refiere a un método de fraccionamiento simple para obtener dichas fracciones usando solo etanol y acetato de etilo como disolventes de extracción. La presente invención se refiere de este modo a composiciones cosméticas que contienen sustancias comunes cosméticamente aceptables y, además, nuevos tipos de fracciones de extractos de arándano rojo, que contienen compuestos fenólicos, especialmente quercetina en forma enriquecida. Las composiciones de la invención contienen de este modo por lo menos una fracción obtenida de polvo de fibra de arándano rojo seco. La invención también se refiere al uso de tales composiciones como, por ejemplo, cremas de emulsión, tales como cremas de día y cremas base, pero también barras de labios, sueros para piel y productos para el cuidado del cabello.

El método de fraccionamiento se basa en tres extracciones en secuencia (Figura 1), siendo llevadas a cabo las etapas de extracción sucesivamente con etanol, acetato de etilo y etanol. Consecuentemente, el polvo de fibra de arándano rojo se extrae primero con etanol (EtOH). Después de la evaporación, el residuo se puede separar en dos fracciones mediante la segunda extracción con acetato de etilo (EtAC). Después de unas pocas etapas intermedias, otra extracción con etanol produce dos fracciones adicionales. Todas las fracciones terminadas incluyen cantidades muy bajas de los disolventes usados.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Etapas esenciales de procedimiento del fraccionamiento.

Figura 2. Cromatogramas de fracciones F1-F3 de polvo de fibra de arándano rojo analizadas por HPLC-DAD a 360 nm.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han mostrado que la parte fibrosa seca del residuo de prensa de arándano rojo sin semillas es una buena materia prima para preparar fracciones que contienen compuestos fenólicos de arándano rojo. El arándano rojo es una baya salvaje comercialmente importante y el zumo de arándano rojo es un uso alimentario apreciado de los arándanos rojos. Por consiguiente, el residuo potencial de la prensa de arándano rojo está fácilmente disponible para ser usado en nuevas aplicaciones no alimentarias. Como corriente secundaria de grado alimentario, está ya disponible como materia prima limpia y segura para preparar ingredientes para, por ejemplo, aplicaciones cosméticas en las que se aprecian los ingredientes de origen natural.

Como se indica anteriormente, muchos disolventes orgánicos se pueden usar para extraer y fraccionar compuestos fenólicos de bayas. Las composiciones de los extractos y fracciones son altamente dependientes de los disolventes y procedimientos usados. En lugar de usar disolventes nocivos o, por ejemplo, etapas de purificación o secado

laboriosas y que aumentan los costes, los inventores describen aquí un nuevo método de fraccionamiento simple que, además de a pequeña escala, también se puede aumentar de escala fácilmente a una escala mayor para la producción comercial, sin altos costes de inversión innecesarios.

5 En este nuevo método, solo se usan etanol y acetato de etilo en las extracciones. Estos disolventes orgánicos se consideran tan seguros que no se establecieron límites residuales máximos en formulaciones alimentarias en la directiva 2009/32/EC del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo. El etanol y el acetato de etilo se han incluido en las listas de posibles disolventes en algunos de los métodos de extracción descritos anteriormente para compuestos fenólicos. Sin embargo, en la presente invención, estos disolventes se utilizan sin diluir y de una nueva manera.

10 Consecuentemente, en la presente invención las corrientes secundarias de la industria de bayas, especialmente la torta de prensa obtenida cuando se prensa zumo de arándano rojo (*Vaccinium vitis-idaea*), se explotan para producir ingredientes que son útiles en composiciones cosméticas. Los inventores han encontrado ahora que ciertas fracciones de extracto de arándano rojo, que se preparan según esta invención, son particularmente ventajosas para su inclusión en composiciones cosméticas. Se mostró que las fracciones usadas tienen una alta capacidad de absorbanza de radicales oxígeno (ORAC) y efectos antioxidantes beneficiosos cuando se usan en composiciones de cosméticos. Se mostró que la quercetina encontrada en estas fracciones aparece principalmente en forma de un aglicón frente a la producción de H₂O₂ inducida por UV. Además, se muestra que las fracciones tienen efectos anti-envejecimiento, es decir, muestran efectos inhibidores de la actividad de la elastasa y la liberación de elastasa por leucocitos polimorfonucleares (PMN). Además, se ha estudiado el efecto de las fracciones sobre la expresión de genes seleccionados después del estrés en queratinocitos. Se mostró que las fracciones promueven el mecanismo de reparación génica después del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno. La fracción F3 como se describe a continuación también mostró tener un papel protector contra la degradación del colágeno de tipo II.

25 Se pueden usar arándanos rojos enteros o zumo en la preparación de extractos que contienen compuestos fenólicos de arándano rojo, pero la presente invención utiliza la torta de prensa. Se encontró que la torta de prensa seca de arándano rojo, de la que se han retirado las semillas, es una buena fuente de compuestos útiles para aplicaciones cosméticas. Para los propósitos de esta invención, esta materia prima se denomina polvo de fibra de arándano rojo. El material de piel de baya rico en fibra seca contiene cantidades significativas de compuestos fenólicos de la baya original en forma concentrada.

30 En comparación con las bayas enteras, la torta de prensa y el polvo de fibra preparado a partir de ella contiene menos azúcares y ácidos orgánicos, que en su mayoría siguen al zumo en el prensado. Por consiguiente, no se necesitan complicadas etapas de purificación que usan, por ejemplo, columnas de resina, que se incluyen en muchos métodos existentes para fraccionar y recuperar compuestos fenólicos, cuando se usa polvo de fibra seca de arándano rojo como materia prima en el método de la presente invención.

35 Para los propósitos de esta invención es ventajoso obtener fracciones que contienen compuestos que tienen actividades antioxidantes. Tales fracciones contienen compuestos fenólicos en general, y quercetina en particular. En el método de la invención, diferentes extractos y fracciones ricas en quercetina se obtienen de polvo de fibra de arándano rojo. Las fracciones se utilizan como ingredientes cosméticos según la presente invención. Las concentraciones de compuestos fenólicos totales, así como la concentración de quercetina, y las capacidades antioxidantes (ORAC) de las fracciones de principal interés son altas.

40 Las características esenciales del procedimiento de fraccionamiento de la invención son las extracciones secuenciales y las evaporaciones de disolvente subsecuentes y, entre estas etapas, las separaciones simples de las fracciones formadas. El polvo seco de fibra de arándano rojo se usa como materia prima y solo se usan etanol y acetato de etilo sin diluir en las extracciones. El bajo contenido de agua disminuye los costes de evaporación como tales y promoviendo el reciclaje de disolventes. También asegura el uso de métodos simples para separar las fracciones formadas en las etapas intermedias. El objetivo de la presente invención es producir fracciones ricas en quercetina en lugar de quercetina de alta pureza.

45 El secado es importante para explotar la torta de prensa de bayas en general, así como según el método descrito aquí. El secado ayuda a mantener la actividad de los compuestos fenólicos y proporciona ventajas en logística y eficiencia de procesado. Los métodos para preparar polvos de fibra de arándano rojo están actualmente en uso y tales polvos están comercialmente disponibles. La quercetina existe en forma de diversos glucósidos en arándanos rojos, pero curiosamente los inventores encontraron que la quercetina en forma de aglicón parece ser el principal compuesto flavonol en fracciones hechas de polvo de fibra de arándano rojo. Lo más probablemente la quercetina se libera de sus glucósidos durante el tratamiento enzimático antes de prensar el zumo de arándano rojo. Es una práctica común usar enzimas pectinolíticas para descomponer las estructuras rígidas de las bayas con el fin de incrementar la producción de zumo. En general, los aglicones de compuestos fenólicos muestran una mayor actividad antioxidante en comparación con sus glucósidos. Por consiguiente, el polvo de fibra de arándano rojo es una materia prima sobresaliente en la preparación de fracciones de alta actividad para composiciones cosméticas.

Las etapas esenciales del procedimiento en el método de la presente invención son (Figura 1):

- 1) El polvo de fibra de arándano rojo se extrae con etanol (EtOH).
- 2) El extracto E1 se separa del residuo de extracción (fracción de fibra).
- 3) El EtOH se evapora de E1; el residuo ER1 es la Fracción F1.
- 4) El ER1 se extrae con acetato de etilo (EtAC).
- 5) El extracto E2 está separado de la fracción roja.
- 6) El EtAC se evapora de E2; se obtiene el residuo ER2.
- 7) El ER2 se extrae con EtOH.
- 8) El extracto E3 se separa de la capa de lípido.
- 9) El EtOH y los restos de EtAC se evaporan de E3; el residuo ER3 es la Fracción F3.
- 10) Un procedimiento alternativo a las etapas 8-9 es la evaporación de EtOH y restos de EtAC sin retirar la capa de lípido. El residuo resultante ER4 es la Fracción F2.

La primera etapa (1) del procedimiento comprende la extracción del polvo de fibra de arándano rojo con etanol en la que la quercetina y otros flavonoles se extraen bien pero, por ejemplo, las antocianinas o proantocianidinas en menor medida. La extracción se lleva a cabo ventajosamente usando ultrasonidos, pero también se pueden usar otros métodos de extracción actualmente disponibles. Cuando el residuo de extracción sólido que contiene fibra se separa (2), se obtiene el extracto E1. Después de que el etanol se evapora de E1 queda (3) un residuo ER1 de evaporación de tipo pasta. Se denomina Fracción F1, que es útil en las composiciones cosméticas de la presente invención.

La Fracción F1 se obtiene usando la extracción selectiva con etanol para favorecer el enriquecimiento de quercetina, pero también contiene en cierta medida otros compuestos solubles en etanol, por ejemplo, compuestos fenólicos rojos (como antocianinas y proantocianidinas) y lípidos (como grasas, aceites y ceras). La fracción F1 aún se puede fraccionar para obtener nuevas fracciones, en las que las concentraciones relativas de quercetina se incrementan adicionalmente.

En la segunda extracción, la fracción F1 se extrae con acetato de etilo (4). La quercetina es bien soluble en acetato de etilo, mientras que la mayoría de los compuestos fenólicos de la Fracción F1 comienzan a separarse de la disolución. Se deja en reposo sin agitación después de una breve mezcla suave, y una marcada fracción roja pronto comienza a depositarse en el fondo del recipiente de extracción. Por consiguiente se pueden usar (5) medios simples para separar el extracto E2 de la parte superior de la fracción roja. Los posibles métodos como succión, decantación o filtrado son aplicables a esta etapa del procedimiento dependiendo de, por ejemplo, el tiempo de deposición e instrumentación disponible.

El acetato de etilo se retira de E2 por evaporación (6). El acetato de etilo se evapora fácilmente, pero pequeñas cantidades tienden a permanecer en el residuo ER2. El acetato de etilo se considera lo suficientemente seguro de modo que no se han establecido límites residuales máximos, por ejemplo, para aplicaciones alimentarias (2009/32/EC). Sin embargo, el olor a acetato de etilo incluso en bajas concentraciones es muy penetrante y, por lo tanto ER2 no es útil en aplicaciones cosméticas. La evaporación completa de los restos de acetato de etilo en esta etapa del procedimiento no es necesaria (como se muestra a continuación) sino que solo incrementaría el tiempo y los costes de evaporación.

La tercera extracción (7) se lleva a cabo con etanol para retirar los restos de acetato de etilo de ER2, pero de nuevo se proporciona un método de fraccionamiento simple para obtener nuevas fracciones. Cuando ER2 se extrae con etanol, se forma una capa de lípido que se deposita en el fondo. La capa de lípido, que tiene una marcada interfase con la capa de etanol superior, se forma incluso más fácilmente que la fracción roja durante la etapa de extracción anterior. Los métodos simples como la succión o la decantación son aplicables para separar el extracto E3 de la fracción de lípido (8). Después de que se evaporan los restos de etanol y acetato de etilo del extracto E3 (9) el residuo de evaporación sin disolvente ER3, es decir, se obtiene la fracción F3. La fracción F3 es útil en composiciones cosméticas.

Como alternativa a las etapas del procedimiento para obtener la fracción F3, la tercera extracción con etanol se puede usar para retirar solo los restos de acetato de etilo de ER2. En este caso, la extracción de etanol se realiza en ER2, pero la capa formadora de lípido no se separa del extracto E3, sino que se deja mezclar en el residuo durante la evaporación de los disolventes (10). Se obtiene residuo de evaporación sin disolvente ER4, y para los propósitos de esta invención se denomina fracción F2, ya que su contenido de quercetina está entre las fracciones finales F1 y F3. Todas las fracciones terminadas incluyen cantidades muy bajas de disolventes usados.

El contenido de quercetina y fenoles totales además de la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) se midieron a partir de las fracciones principales (F1, F2, F3; Figura 1) y de las fracciones secundarias (fracción roja y fracción de lípido; Figura 1) preparadas según el método de la presente invención (Ejemplos 1 y 2). Tanto las concentraciones de quercetina como los valores de ORAC se incrementan en las fracciones principales en el orden F1 < F2 < F3. En comparación con F1, la fracción F2 se concentra con respecto a la quercetina a medida que se retira la fracción roja. Asimismo, la fracción F3 tiene la concentración más alta de quercetina en comparación con las otras dos fracciones, porque se retiran tanto la fracción roja como la fracción de lípido.

Los compuestos de la fracción roja (principalmente antocianinas y proantocianidinas) son antioxidantes conocidos y el valor de la ORAC de la fracción roja es bastante alto. Sin embargo, cuando la fracción roja se retira de la fracción F1, la capacidad antioxidante se incrementa debido al enriquecimiento de quercetina y otros posibles compuestos activos en las fracciones F2 y F3. Los compuestos rojos en grandes cantidades no son apropiados en formulaciones en las que no se desea el color rojo fuerte o en aplicaciones en las que su color no es estable. Dependiendo de, por ejemplo, con que precisión se realicen las etapas de separación, algo de quercetina puede seguir a las fracciones secundarias. La fracción de lípido está prácticamente libre de quercetina y capacidad antioxidante (Ejemplo 2).

En el procedimiento de la presente invención, se puede realizar la optimización de los parámetros en cualquiera de las etapas del procedimiento, dependiendo de las propiedades deseadas de las fracciones resultantes. Por ejemplo, la relación de acetato de etilo a residuo de evaporación ER1 en la etapa 4 de extracción influye en la composición de las fracciones F2 y F3 con respecto al tipo y cantidad de compuestos fenólicos rojos. Cuanto más acetato de etilo se usa más fracción roja se forma. Las altas cantidades de acetato de etilo y la separación precisa del extracto de E2 en la etapa 5 proporcionan fracciones F2 y F3 que están prácticamente libres de compuestos fenólicos rojos. Sin embargo, para los propósitos de la presente invención, solo se necesita una pequeña cantidad de acetato de etilo como se muestra en el Ejemplo 1. Se ve como una ventaja que las fracciones ricas en quercetina también contengan en cierta medida compuestos fenólicos rojos y otros compuestos del diverso conjunto de compuestos fenólicos de bayas, que probablemente juntos tienen sinergia en la protección biológica de las bayas originales y como un ingrediente en composiciones cosméticas.

La composición cosmética según la presente invención puede ser, por ejemplo, una crema de emulsión, tal como crema de día o crema base; un lápiz de labios; un suero para la piel o un producto cosmético para el cabello, tal como una composición para el cuidado del cabello o del cuero cabelludo. Las fracciones F1 y F3 se analizaron y se encontró que proporcionan propiedades ventajosas a tales composiciones. Específicamente, la fracción F3 rica en quercetina puede reemplazar a la quercetina producida químicamente en tales composiciones cosméticas. La expresión "Fracciones F1, F2, (y) F3 de arándano rojo" tal como se usa a continuación se pretende que abarque las tres fracciones principales ricas en quercetina obtenidas del procedimiento de extracción según la presente invención.

Una composición cosmética según la invención contiene, dependiendo del uso pretendido de la composición, por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo en una cantidad de 0,001 a 25% en peso, más preferentemente la cantidad de las fracciones es de 0,01 a 5% en peso, y lo más preferentemente de 0,01 a 1% en peso.

La composición cosmética según la invención también puede contener, dependiendo del uso pretendido de la composición, aceite de semillas de arándano rojo en una cantidad de 0,1 a 25% en peso, más preferentemente el contenido de aceite de semillas es de 0,1 a 5% en peso, y lo más preferentemente de 0,5 a 3% en peso.

Adicionalmente, la composición cosmética según la invención también puede contener, dependiendo del uso previsto de la composición, diferentes agentes de cuidado, por ejemplo, péptidos. Los agentes de cuidado están típicamente en la cantidad de 0,1 a 40% en peso, más preferentemente el contenido de agente de cuidado de un producto es de 0,1% a 20% en peso, y lo más preferentemente de 1 a 5% en peso.

La crema de emulsión según la invención que contiene por lo menos una de las Fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo puede ser del tipo de emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite, emulsión agua-aceite-agua o una microemulsión. La composición de crema de emulsión según la invención contiene por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo en una cantidad preferentemente de 0,001 a 25% en peso, más preferentemente de 0,01 a 5% en peso y lo más preferentemente de 0,01 a 1% en peso. El contenido de aceite de semilla de arándano rojo en una crema de emulsión puede estar en una cantidad de 0,1 a 25% en peso. Preferentemente, el contenido de aceite de semilla es de 0,1 a 5% en peso y lo más preferentemente de 0,5 a 3% en peso.

Las composiciones de crema de emulsión según la invención contienen, además, uno o más adyuvantes aceptables en el campo de los cosméticos, tales como agentes de conservación, agentes espesantes, agentes hidratantes, y otros aditivos apropiados, tales como, por ejemplo, perfumes y/o agentes colorantes. Los agentes de conservación apropiados son parabenos, benzoato de sodio y fenoxietanol. Estos agentes de conservación se pueden usar solos o combinados entre sí. Como agente espesante se puede usar cualquier agente espesante apropiado en el campo de los cosméticos, con tal de que sea compatible con los otros componentes de la composición, por ejemplo, goma de xantano e hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, goma Sclerotium, Chondrus crispus, poliacrilatos,

poliacrilamidas, polímero reticulado de cetearildimeticona y silicato de aluminio y magnesio. Los agentes espesantes se pueden usar solos o en combinación entre sí. Los agentes hidratantes apropiados son, por ejemplo, undecilenato de heptilo, ácido hialurónico o PCA de sodio. En las cremas de emulsión según la invención se pueden usar también diferentes agentes acondicionadores de la piel, como por ejemplo acetato de tocoferilo, y etilhexilglicerina.

5 Además, uno o más compuestos que actúan como un emulsionante, es decir, un compuesto que dispersa y estabiliza el aceite en agua es necesario en la composición de crema de emulsión. Los emulsionantes útiles son todos los emulsionantes no iónicos aceptados por la legislación de cosméticos, tales como, por ejemplo, estearato de glicerilo, estearato de PEG-5-glicerilo, estearato de PEG-100, dipolihidroxiestearato de PEG-30, lecitina, lecitina hidrogenada y PEG-8 cera de abeja, steareth-21, steareth-2, olivato de sorbitán, así como una mezcla de un
10 glucósido graso, tal como por ejemplo, glucósido de cetearilo, cocoilo, o miristilo y un alcohol graso, tal como por ejemplo alcohol cetearílico, cetílico, estearílico, octildodecanol, triglicérido caprílico/cáprico o alcohol miristílico. Además, son útiles los emulsionantes aniónicos, por ejemplo, ácido esteárico, hidróxido de sodio y trietanolamina. También se pueden usar diferentes agentes quelantes, como EDTA de disodio y ácido cítrico.

15 Las composiciones de lápiz de labios según la invención contienen por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo en una cantidad de preferentemente de 0,001 a 10% en peso, más preferentemente de 0,01 a 5% en peso y lo más preferentemente de 0,01 a 1% en de peso. Además, estas composiciones pueden contener aceite de semilla de arándano rojo en una cantidad de 0,01 a 10% en peso. Preferentemente, el contenido de aceite de semilla es de 0,1 a 5% en peso y lo más preferentemente de 0,5 a 3% en peso.

20 Las composiciones de lápiz de labios según la invención contienen además de por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo también otras sustancias, como diferentes ceras, aceites, agentes colorantes y perlescentes, que son aceptables en el campo de los cosméticos y que son tradicionales componentes de composiciones de lápiz de labios. Las ceras utilizables son las ceras naturales, tales como cera de abejas, de candelilla, carnauba, ceras a base de cereales, cera de yoyoba y sus derivados, además de ceras de parafina y polietilenos sintéticos. Las composiciones de lápiz de labios según la invención pueden contener también
25 emulsionantes como PEG-8, alcohol behenílico y alcohol araquidílico, y varias vitaminas y derivados de ellas, como tocoferol y palmitato de ascorbilo.

Las composiciones de lápiz de labios según la invención pueden contener además uno o más adyuvantes y/o aditivos aceptables en el campo de los cosméticos, tales como agente de conservación. Los agentes de conservación apropiados son, por ejemplo, parabenos. Estos agentes de conservación se pueden usar solos o en
30 combinación unos con otros.

Las composiciones según la invención previstas para el cuidado del cabello o del cuero cabelludo contienen por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo en una cantidad preferentemente de 0,001 a 10% en peso, más preferentemente de 0,001 a 5% en peso y lo más preferentemente de 0,001 a 1% en peso. Estas
35 composiciones también pueden contener aceite de semilla de arándano rojo en una cantidad de 0,01 a 10% en peso. Preferentemente, el contenido de aceite de semilla de arándano rojo es de 0,1 a 5% en peso y lo más preferentemente de 0,1 a 2% en peso. Además, las composiciones según la invención previstas para el cuidado del cabello o del cuero cabelludo también pueden contener diferentes agentes de cuidado, por ejemplo, extracto de brotes de enebro. Estos agentes de cuidado típicamente están en la cantidad de 0,1 a 40% en peso. Preferentemente, el contenido de agente de cuidado de un producto es de 0,1 a 20% en peso.

40 Las composiciones según la invención previstas para el cuidado del cabello o del cuero cabelludo contienen además de por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo también otras sustancias aceptables en el campo de los cosméticos, como sustancias catiónicamente activas, tales como cloruro de cetrimonio, además de una sustancia formadora de emulsión, tal como, por ejemplo, alcohol cetílico, alcohol cetearílico, cetareth-20. Además, las composiciones previstas para el cuidado del cabello o del cuero cabelludo pueden contener uno o más
45 adyuvantes aceptables en el campo de los cosméticos, tales como un derivado de celulosa, etanol y/o agua. También aceites, ceras y alcoholes grasos pueden estar presentes en las composiciones según la invención previstas para el cuidado del cabello o del cuero cabelludo.

Los sueros para la piel según la invención tienen la capacidad molecular de penetrar la piel profundamente en las capas de la piel y depositar los nutrientes donde se necesitarán.

50 Las composiciones de suero según la invención contienen por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo en una cantidad preferentemente de 0,001 a 25% en peso, más preferentemente de 0,01 a 5% en peso y lo más preferentemente de 0,01 a 1% en peso. Las composiciones de suero pueden contener adicionalmente aceite de semilla de arándano rojo en una cantidad de 0,01 a 25% en peso. Preferentemente, el contenido de aceite de semilla es de 0,1 a 5% en peso y lo más preferentemente de 0,5 a 3% en peso.

55 Las composiciones de suero según la invención contienen típicamente también otras sustancias aceptables en el campo de los cosméticos, tales como agentes emulsionantes, agentes quelantes, disolventes, conservantes, estabilizantes junto con sustancias que afectan a la permeabilidad de la piel de la composición. Estas sustancias pueden ser, por ejemplo metilpropanodiol, glicerina, fenoxietanol, copolímero de acrilato de

5 hidroxietilo/acriloiddimetiltaurato de sodio, goma de xantano, propanodiol, copolímero de acriloiddimetiltaurato de amonio/VP, poliisobuteno, EDTA de disodio, lecitina, glucosa, fosfatidilcolina hidrogenada, laurilcarbamato de inulina, (PEG-7)-trimetilolpropanococo-éter, Chondrus crispus, etilpirrolidona, y goma de celulosa. Adicionalmente, las composiciones de suero según la invención contienen diferentes agentes hidratantes y acondicionantes de la piel tales como undecilenato de heptilo, etihexilglicerina, caprililglicol, cocoato de etilhexilo, extracto de turba y glicolípidos.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

Preparación de fracciones F1 y F3 de polvo de fibra de arándano rojo

10 400 g de polvo de fibra de arándano rojo (Kiantama Oy, Suomussalmi, Finlandia) se extrajeron con cuatro litros de etanol (ETAX A, Altia Oyj, Rajamaki, Finlandia) en baño de ultrasonidos (baño ultrasónico Grant XB22, Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Shepreth, Inglaterra, 38 kHz,) durante 3 x 20 minutos, agitando la mezcla entre los tratamientos de ultrasonidos. El residuo fibroso de extracción se separó mediante papel de filtro (5 µm) en un embudo Büchner (bomba de vacío MZ 2C + 2AK, Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Alemania) para obtener el extracto E1.

Se evaporó etanol de E1 en rotavapor (R120 prof V, Büchi Labortechnik AG, Zürich, Suiza) a 45°C, mín. 70 mbar. Se obtuvieron ca. 90 g de residuo de evaporación tipo pasta viscosa rojo oscuro ER1. Se designó como Fracción F1 ("Fracción F1 de arándano rojo") lista para ser usada en composiciones cosméticas como tal.

20 La Fracción F1 se extrajo a continuación con 400 ml de acetato de etilo (EMSURE® Merck KG aA, Darmstadt, Alemania). La fracción roja se separó por medio de papel de filtro (5 µm) en un embudo Büchner para obtener el Extracto E2. El acetato de etilo se evaporó de E2 en rotavapor (45°C, min 70 mbar), por lo que se obtuvo el residuo de la evaporación ER2.

25 El ER2 se extrajo con 300 ml de etanol. La fracción de lípido se separó por decantación para obtener el Extracto E3. Cuando el etanol se evaporó de E3 en Rotavapor (45°C, min 70 mbar) se obtuvieron ca. 18 g de residuo de evaporación rojo anaranjado ER3. Se designó como Fracción F3 ("Fracción F3 de arándano rojo"), lista para ser usada en composiciones cosméticas como tal.

Ejemplo 2

Análisis de las fracciones

30 El contenido de quercetina y fenólico total además de la capacidad de absorbancia de radicales oxígeno (ORAC) se midieron de las fracciones (F1 y F3) preparadas en el Ejemplo 1. Una pequeña cantidad de Fracción F2 libre de disolvente ("Fracción F2 de arándano rojo") y las fracciones secundarias (fracción roja y de lípido) se prepararon para el análisis usando extracción con etanol como se muestra en la etapa 10 del procedimiento (Figura 1).

35 El análisis de la quercetina se realizó por el método de cromatografía de líquidos usando un instrumento Agilent 1100 (Agilent Technologies, Inc.) equipado con un detector de conjunto de fotodiodos (DAD). La fase móvil consistía en eluyente A) ácido fórmico al 1% en agua (v/v) y B) ácido fórmico al 1% en acetonitrilo, y se efectuó el gradiente lineal siguiente: 5-30% de B a un caudal de 0,2 ml/min. La temperatura de la columna (200 x 2,00 mm, 5 µm, C18, 120 Å, HyperClone ODS; Phenomenex) era de 30°C. Se monitorizó el contenido de quercetina a 360 nm y se obtuvieron espectros UV escaneando de 190 a 600 nm. El contenido fenólico total se analizó por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Magalhaes et al., 2010). El análisis de la capacidad de absorción de radical oxígeno (ORAC) se realizó por el método de Huang et al., 2002, en el que los resultados se calcularon como equivalentes de trolox (TE).

40 El contenido de quercetina se incrementa en las fracciones principales en el orden F1 <F2 <F3 (Figura 2). La más alta concentración de quercetina, 4,2 mg/g, en la fracción F3 es alrededor de diez veces mayor que en el polvo de fibra de arándano rojo original (0,4 mg/g). Las fracciones F1 y F2 contenían también alto contenido de quercetina, 1,5 mg/g y 2,4 mg/g, respectivamente. La fracción roja y la fracción de lípido contenían menos quercetina, 0,9 mg/g y 0,3 mg/g, respectivamente.

45 Las capacidades antioxidantes (ORAC) de las fracciones principales se correlacionaban bien con las concentraciones de quercetina: la Fracción F3 tenía el valor más alto de ORAC (750 µmol de TE/g) y F1 el valor más bajo (290 µmol de TE/g), mientras que la capacidad antioxidante de la fracción F2 (430 µmol de TE/g) estaba entre los valores de F1 y F3. El valor de ORAC para la fracción roja era comparativamente alto (490 µmol de TE/g), mientras que el valor de ORAC para la fracción de lípido era muy bajo (30 µmol de TE/g).

El contenido fenólico total analizado por el método de Folin-Ciocalteu, apoyaba los resultados de quercetina y ORAC de las fracciones principales: la fracción F3 tenía el más alto contenido (28 mg/g), mientras que las fracciones F1 y F2 eran bastante iguales, 21 mg/g y 19 mg/g, respectivamente. El contenido fenólico total en la fracción roja (29

μmol de TE/g) era comparativo con la fracción F3, aunque el valor de ORAC de la fracción F3 era mucho mayor que el de la fracción roja. Esto indica que los compuestos enriquecidos en la Fracción F3 eran más activos en la medida de la capacidad antioxidante que los compuestos en la fracción roja. El contenido de compuestos fenólicos totales en la fracción de lípido era bajo (9 μmol de TE/g).

5 Ejemplo 3

Evaluación del efecto antioxidante

Los potenciales efectos antioxidantes de las fracciones F1 y F3 se evaluaron in vitro midiendo la producción de peróxido de hidrógeno en queratinocitos humanos normales irradiados con UVA + B usando una sonda fluorescente específica (dHR, dihidrorodamina). Los queratinocitos se sembraron en medio de cultivo y se incubaron durante 48 horas. El medio de cultivo se reemplazó a continuación por medio de ensayo y las células se incubaron adicionalmente durante 24 horas. A continuación, las células se incubaron en presencia de la sonda fluorescente específica para la medida de peróxido de hidrógeno (dHR) durante 10 minutos antes de añadir o no (controles) los compuestos de ensayo (F1 o F3) o la referencia (BHA, 100 μM). Las células se pre-incubaron durante 45 minutos y a continuación se irradiaron o no (control no irradiado) con UVA + UVB (UVA 2,6 J/cm² UVB + 180 mJ/cm²). Después de la irradiación, las células se incubaron durante 30 minutos antes del análisis por citometría de flujo. Un control sin sonda se realizó en paralelo y todas las condiciones experimentales se realizaron en n = 3. La intensidad fluorescente de la sonda dHR, expresada en unidades arbitrarias (AU), es proporcional a la producción de H₂O₂. La adquisición se realizó por citometría de flujo en 10.000 sucesos para cada réplica usando un BD FACSSarray™ Bioanalyzer (Becton-Dickinson).

La irradiación de queratinocitos con 180 mJ/cm² de UVB claramente incrementó la producción de H₂O₂ y el tratamiento con el BHA de referencia a 100 μM dio como resultado una protección significativa de las células de la producción de H₂O₂ inducida por UV (63% de protección). Estos efectos eran esperados y validaron el ensayo.

La fracción F3, ensayada de 0,01 a 0,3 mg/ml (diluida con etanol), mostró un efecto protector fuerte, claro y dependiente de la concentración en queratinocitos frente a la producción de H₂O₂ inducida por UV (48%, 89% y 124% de protección a 0,03, 0,1 y 0,3 mg/ml, respectivamente). La fracción F1 también mostró un efecto protector frente a la producción de H₂O₂ inducida por UV. Sin embargo, este efecto solo se observó en la concentración de ensayo más alta de 0,3 mg/ml (91% de protección).

Ejemplo 4

Evaluación de los efectos inhibidores de la actividad de elastasa y la liberación de elastasa

Los efectos antienviejimiento de las fracciones F1 y F3 se estudiaron midiendo la actividad enzimática de la elastasa, una enzima responsable de la degradación de la elastina. La elastina, una proteína del tejido conjuntivo (es decir, la matriz extracelular), es una fibra elástica que permite que la piel vuelva a su posición original después del estiramiento.

Los efectos de las fracciones se evaluaron realizando un ensayo bioquímico de la actividad de la elastasa y un ensayo celular de la liberación de elastasa por neutrófilos (denominados también leucocitos polimorfonucleares o PMN). Los PMN, el tipo más común de granulocitos, fagocitan y destruyen microorganismos, por ejemplo, bacterias, y de este modo juegan un papel clave en la inmunidad innata contra la infección bacteriana. La elastasa almacenada en los gránulos intracelulares de PMN activados es una enzima esencial para la degradación de proteínas extrañas durante la fagocitosis. Una vez liberada de los PMN, la elastasa puede causar graves daños a las macromoléculas en las membranas celulares y el espacio extracelular, incluyendo proteoglicanos, elastina y fibronectina.

Se usó el péptido formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) en asociación con citocalasina B, una micotoxina permeable a las células, para estimular la liberación de elastasa por los neutrófilos. La quercetina, un flavonoide que presenta propiedades inmunomoduladoras inhibiendo las enzimas que participan en la producción de moléculas inflamatorias, se usó como molécula comparativa dado que se describió anteriormente como una molécula inhibidora por Kanashiro et al. 2007 en la liberación de elastasa por PMN estimulados con (fMLP + CB). Las concentraciones de quercetina en el presente estudio se seleccionaron para igualar la concentración ensayada en la publicación de Kanashiro et al., 2007.

Cuantificación de la actividad de la elastasa:

Los compuestos de ensayo o referencia (AAPV ensayado a 0,1 mM) se preincubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT) en presencia de la enzima (elastasa de leucocito humano: EC 3.4.21.37). El sustrato fluorescente (DQ™-elastina) se añadió a continuación y las mezclas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Un control de interferencia compuesto en presencia de medio reactivo sin enzima (medida de autofluorescencia) y un control de "extinción" (absorción de fluorescencia final por el compuesto) se llevaron a cabo en paralelo. Todas las condiciones experimentales se realizaron en n = 3 a excepción de los controles de interferencia y extinción, que se realizaron en n = 2. Al final de la incubación, la fluorescencia producida después de la degradación del sustrato se midió por fluorometría (lex 485 nm, lem 538 nm, SpectroMax Gemini, Molecular

Devices®). Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición de la actividad enzimática.

5 El compuesto de referencia de AAPV, ensayado a 0,1 mM, inhibía altamente la actividad de la elastasa de leucocitos (95% de inhibición). Este efecto era esperado y validaba este ensayo. La fracción F3 ensayada a 0,3 y 1 mg/ml (diluida en etanol) mostró un efecto inhibidor significativo dependiente de la concentración en la actividad de la elastasa de leucocitos humanos que alcanza el 72% de inhibición a la concentración más alta. La fracción F1 ensayada a 0,3 y 1 mg/ml (diluida en etanol) también presentaba un efecto inhibidor significativo dependiente de la concentración de la actividad de la elastasa de los leucocitos humanos (66% de inhibición a la concentración más alta).

Liberación de elastasa por PMN estimulado seguido de la medida de la actividad de la elastasa:

10 PMN, aislados de sangre periférica humana (donante masculino de 22 años), se preincubaron durante 10 minutos en medio de ensayo que contiene o no (controles) las fracciones de ensayo F1 y F3 en presencia o no (control no estimulado) de citocalasina B (1µM). La desgranulación se desencadenó añadiendo fMLP (1µM) y las células se incubaron durante 30 minutos. Todas las condiciones experimentales se realizaron en n = 3, a excepción de los controles que se realizaron en n = 6. Al final de la incubación, los sobrenadantes celulares se recogieron para
15 cuantificar la actividad de la elastasa liberada y, de este modo, para estimar indirectamente la cantidad de elastasa liberada.

20 El sustrato péptido de elastasa N-succinil-Ala-Ala-Val-p-nitroanilida (SAAVNA, 1 mM) se añadió a todos los sobrenadantes y la liberación del producto amarillo p-NA se cuantificó por fotometría a 405 nm después de la adición (T0) de sustrato y después de 20 horas de incubación. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición de la actividad enzimática.

25 El tratamiento con la asociación de citocalasina B y fMLP inducía altamente la liberación de elastasa por PMN. Este resultado era esperado y validaba el ensayo. La fracción F3, ensayada a 0,03, 0,1 y 0,3 mg/ml (diluida en etanol) mostró un efecto inhibidor dependiente de la concentración en la liberación de elastasa por PMN estimulados con fMLP + CB (17, 27 y 45% de inhibición). También se observó un efecto inhibidor dependiente de la concentración de la elastasa en presencia de las concentraciones más altas de Fracción F1 (13 y 37% de inhibición a 0,1 y 0,3 mg/ml, respectivamente). La quercetina solo mostró un efecto inhibidor débil de la liberación de elastasa por PMN estimulados (7 y 13% de inhibición cuando se ensayó a 3 y 10 µM).

Ejemplo 5

Efectos en los cambios de la expresión génica después del estrés oxidativo en queratinocitos.

30 Se estudiaron los efectos de las Fracciones F1 y F3 en los cambios de expresión génica después del estrés oxidativo en queratinocitos. La primera parte del estudio consistía en ensayar la solubilidad de las fracciones F1 y F3 y evaluar sus efectos sobre la morfología de los queratinocitos humanos. Se determinó la concentración óptima de los compuestos que era tolerada por las células. Las concentraciones seleccionadas eran 0,125 mg/ml para F1 y 0,05 mg/ml para F3. Se cultivaron células HPEK (células progenitoras de queratinocitos epidérmicos humanos normales) en medio de queratinocitos epidérmicos que contiene suplementos por debajo del 5% de CO₂ a 37°C
35 durante 24 horas. Cada muestra se preparó por duplicado. Las fracciones F1 y F3 se añadieron a continuación sobre las células y las células se cultivaron adicionalmente durante 24 h en presencia de las fracciones antes de que se trataran con H₂O₂ 500 µM durante 30 minutos para inducir estrés oxidativo o se dejaron sin tratar (la concentración de H₂O₂ se eligió en base a la inducción de ROS y al nivel de cambios en la expresión génica). Las
40 células que se trataron con H₂O₂ se lavaron antes y después del tratamiento con H₂O₂ que se realizó en medio de cultivo sin suplementos. Después del lavado, los pocillos tratados y sin tratar recibieron medio nuevo que contenía fracciones F1 y F3. Las células se cultivaron adicionalmente durante 6 horas para permitir la inducción de la expresión génica. Después del aislamiento del ARN y la preparación del ADNc, los niveles de ARN mensajero de los genes seleccionados se determinaron usando PCR Taqman cuantitativa. Los niveles de expresión de todos los
45 genes se normalizaron a la expresión de β-actina que es un gen de referencia usado comúnmente para análisis de ARN. Los resultados finales consisten en los niveles de expresión génica promedio de dos experimentos de PCR independientes.

50 La sirtuina 1 (SIRT1) está implicada en la reparación del daño al ADN causado por el estrés oxidativo. La expresión de SIRT1 incrementada promueve la supervivencia y suprime los cambios dependientes de la edad en un modelo de ratón. Tanto F1 como F3 incrementaron la expresión de SIRT1 en el estrés oxidativo. En otras palabras; se ha mostrado que F1 y F3 promueven el mecanismo de reparación génica en el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.

55 El gen de detención del crecimiento y del daño inducible al ADN, alfa (GADD45A) es un gen que se induce después de las condiciones estresantes de detención del crecimiento y de daño al ADN. En las celdas, los niveles de GADD45A se deben incrementar después del estrés oxidativo. En este estudio, se indujo la expresión de GADD45A en respuesta al estrés oxidativo y el incremento se potenció adicionalmente por F1 y F3. En otras palabras; se mostró que F1 y F3 promueven el mecanismo de reparación génica después del estrés oxidativo inducido por

peróxido de hidrógeno.

5 La tiorredoxina (TXN) es una proteína antioxidante, estimuladora del crecimiento y antiinflamatoria. El estrés oxidativo induce la expresión de TXN. Tanto F1 como F3 incrementaron la expresión de TXN en el estrés oxidativo. Esto quiere decir que F1 y F3 pueden tener efectos beneficiosos en los queratinocitos en condiciones normales y de estrés, como las tiorredoxinas son antioxidantes que se sabe que reducen el estrés oxidativo y la sobreexpresión de tiorredoxina ha sido relacionada con la inflamación mejorada.

La metaloproteinasas 13 de la matriz (MMP13) es una proteinasa clave en la degradación del colágeno de tipo II. El estrés oxidativo induce la expresión de MMP13. Se mostró que F3 disminuye la expresión de MMP13 en condiciones normales, de este modo F3 tiene un papel protector contra la degradación del colágeno de tipo II.

10 **Ejemplo 6**

15 Un ejemplo de los ingredientes para una composición de crema de emulsión lista para el uso (crema de día) para cuidado de la piel facial y de la garganta que contiene aceite de semilla de arándano rojo y por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo se muestra en la Tabla 1. La composición de crema de emulsión descrita hidrata, ilumina y suaviza la piel. Además, la crema de emulsión según la invención posee propiedades antioxidantes.

Tabla 1. Crema de día

| INGREDIENTES | % de proporción |
|--|------------------|
| Aqua (Agua) | Añadir hasta 100 |
| Steareth-2 | 4,0-5,0 |
| Dimeticona | 3,0-5,0 |
| Glicerina | 2,0-5,0 |
| Steareth-21 | 2,500 |
| Octildodecanol | 1,0-3,0 |
| Ácido esteárico | 1,0-3,0 |
| Aceite de semilla de arándano rojo | 0,1-5,0 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,1-5,0 |
| Alcohol cetearílico | 1,500 |
| Undecilenato de heptilo | 1,0-2,0 |
| Triglicérido caprílico/cáprico | 1,000 |
| Dipolihidroxiestearato de PEG-30 | 0,5-1,0 |
| Almidonoctenilsucinato de aluminio | 0,5-1,0 |
| Fenoxietanol | 0,5-1,0 |
| Polímero reticulado de cetearildimeticona | 0,5-1,0 |
| Acetato de tocoferilo | 0,2-0,8 |
| (PPG-15)-estearil-éter | 0,3-0,6 |
| Perfume (Fragancia) | 0,390 |
| Lecitina | 0,203 |
| Goma de xantano | 0,15-0,2 |
| Polímero reticulado de acrilatos/acrilato de alquilo de C ₁₀₋₃₀ | 0,100 |
| EDTA de disodio | 0,100 |

| INGREDIENTES | % de proporción |
|-----------------------------|-----------------|
| Ascorbilfosfato de magnesio | 0,100 |

Ejemplo 7

5 Un ejemplo de ingredientes para la composición de emulsión de crema (crema de día) lista para usar que contiene por lo menos una de las Fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo para el cuidado facial y de la piel de la garganta se presenta en la siguiente Tabla 2. La composición de crema de emulsión mejora la revitalización de la piel. Además, reduce, ablanda y suaviza las líneas finas en la piel. También tiene propiedades antioxidantes.

Tabla 2. Crema de día

| INGREDIENTES | % de proporción |
|--|------------------|
| Aqua (Agua) | Añadir hasta 100 |
| Steareth-2 | 4,0-5,0 |
| Dimeticona | 3,0-5,0 |
| Glicerina | 2,0-5,0 |
| Steareth-21 | 2,500 |
| Octildodecanol | 1,0-3,0 |
| Ácido esteárico | 1,0-3,0 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,01-5,0 |
| Alcohol cetearílico | 1,500 |
| Undecilenato de heptilo | 1,0-2,0 |
| Triglicérido caprílico/cáprico | 1,000 |
| Dipolihidroxiestearato de PEG-30 | 0,5-1,0 |
| Almidonoctenilsuccinato de aluminio | 0,5-1,0 |
| Fenoxietanol | 0,5-1,0 |
| Polímero reticulado de cetearildimeticona | 0,5-1,0 |
| Acetato de tocoferilo | 0,2-0,8 |
| (PPG-15)-estearil-éter | 0,3-0,6 |
| Perfume (Fragancia) | 0,390 |
| Lecitina | 0,203 |
| Goma de xantano | 0,15-0,2 |
| Polímero reticulado de acrilatos/acrilato de alquilo de C ₁₀₋₃₀ | 0,100 |
| EDTA de disodio | 0,100 |
| Ascorbilfosfato de magnesio | 0,100 |

10 Ejemplo 8

En la Tabla 3 se presenta un ejemplo de ingredientes para una composición de crema base de las Fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo para la piel facial. La crema hidrata la piel y la protege de la radiación UV. La crema también

da cobertura ligera y color a la piel.

Tabla 3. Crema base

| INGREDIENTES | % de proporción |
|---|-----------------|
| Aqua (Agua) | 50,0-55,0 |
| Ciclopentasiloxano | 10,0-15,0 |
| Dióxido de titanio (CI 77891) | 5,0-10,0 |
| Ciclohexasilosano | 3,0-5,0 |
| Isododecano | 2,0-10,0 |
| Metoxicinamato de etilhexilo (Octinoxato) | 1,0-6,0 |
| Isoestearato de poliglicerilo-4 | 1,0-2,0 |
| Sulfato de magnesio | 1,0-2,0 |
| Cetil PEG/PPG-10/1 dimeticona | 1,0-2,0 |
| Laurato de hexilo | 1,0-2,0 |
| Óxidos de hierro (CI 77491) | 1,0-2,0 |
| MICA | 1,0-2,0 |
| Nylon-12 | 0,5-1,0 |
| Propilenglicol | 0,5-1,0 |
| Dióxido de titanio | 0,5-1,0 |
| Fenoxietanol | 0,5-1,0 |
| Hectorita diesteardimonio | 0,5-1,0 |
| Sílice | 0,5-1,0 |
| Óxidos de hierro (CI 77492) | 0,1-1,0 |
| Butilenglicol | 0,1-1,0 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,01-5,0 |
| Óxidos de hierro (CI 77499) | 0,1-1,0 |
| Perfluorooctiltrietoxisilano | 0,1-1,0 |
| Carbonato de propileno | 0,05-0,3 |
| Polímero reticulado de dimeticona | 0,05-0,3 |
| Meticona | 0,05-0,3 |
| Perfume (Fragancia) | 0,05-0,3 |
| Etilhexilglicerina | 0,05-0,3 |
| Alúmina | 0,05-0,3 |
| Trietoxicaprililsilano | 0,05-0,3 |

Ejemplo 9

Un ejemplo de ingredientes para una composición de barra de labios que contiene por lo menos una de las Fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo se presenta en la Tabla 4. La composición de lápiz de labios según la invención hidrata los labios y proporciona cuidado labial.

5 Tabla 4. Una composición de lápiz de labios

| INGREDIENTES | % de proporción |
|---|------------------|
| Aceite de semilla de ricino común | Añadir hasta 100 |
| Escualano | 17,500 |
| Cera de candelilla | 12,100 |
| Ésteres de aceite se semilla de melocotón y peg-6 | 8,000 |
| Lanolina acetilada | 5,900 |
| Agua | 5,000 |
| Peg-8 cera de abeja | 4,700 |
| Polideceno hidrogenado | 4,000 |
| Butyrospermum parkii | 4,000 |
| Miristato de isopropilo | 3,900 |
| Cera alba | 2,300 |
| Etilcelulosa | 2,000 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,01-2,0 |
| Polietileno | 2,000 |
| Mica | 1,800 |
| Alcohol araquidílico | 1,400 |
| Alcohol behenílico | 1,300 |
| Araquidilglucósido | 1,300 |
| Perfume | 1,000 |
| Aceite de semilla de arándano rojo | 1,000 |
| Cera carnauba | 0,900 |
| Propilparabeno | 0,100 |
| PEG-8 | 0,100 |
| Tocoferol | 0,035 |
| Palmitato de ascorbilo | 0,006 |
| Ácido ascórbico | 0,001 |
| Ácido cítrico | 0,001 |
| Colores | 4,800 |

Ejemplo 10

Otro ejemplo de una composición de lápiz de labios que contiene por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo y aceite de semilla de arándano rojo se presenta en la Tabla 5.

5 Tabla 5. Otra composición de lápiz de labios

| INGREDIENTES | % de proporción |
|--|------------------|
| Aceite de semilla de ricino común | Añadir hasta 100 |
| Alcohol oleílico | 20,000 |
| Cera de candelilla | 9,800 |
| Cera alba | 5,700 |
| Lanolina acetilada | 4,700 |
| Lanolato de isopropilo | 4,000 |
| Miristato de isopropilo | 3,200 |
| Polideceno hidrogenado | 3,000 |
| Metoxicinamato de etilhexilo | 2,000 |
| Mica | 1,800 |
| Cera microcristalina | 1,600 |
| Aceite de semillas de arándano rojo | 1,000 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,01-2,0 |
| Perfume | 1,000 |
| Carnauba | 0,700 |
| Propilparabeno | 0,090 |
| PEG-8 | 0,040 |
| Tocoferol | 0,020 |
| Palmitato de escorbilo | 0,003 |
| Ácido ascórbico | 0,001 |
| Ácido cítrico | 0,001 |
| Colores | 4,800 |

Ejemplo 11

Un ejemplo de ingredientes para un producto de suero facial que contiene por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo se presenta en la Tabla 6.

10

Tabla 6. Una composición de suero facial

| INGREDIENTES | % de proporción |
|-------------------------|------------------|
| Aqua (Agua) | Añadir hasta 100 |
| Undecilenato de heptilo | 4,000 |

| INGREDIENTES | % de proporción |
|--|-----------------|
| Metilpropanodiol | 3,000 |
| Glicerina | 3,000 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,01-2,0 |
| Fenoxietanol | 1,000 |
| Copolímero de acrilato de hidroxietilo/acrilodimetiltaurato de sodio | 0,300 |
| Goma de xantano | 0,1-0,4 |
| PVP | 0,200 |
| Etilhexilglicerina | 0,200 |
| Propanodiol | 0,163 |
| Copolímero de acrilodimetiltaurato de amonio/VP | 0,150 |
| Caprililglicol | 0,150 |
| Poliisobuteno | 0,150 |
| Cocoato de etilhexilo | 0,100 |
| EDTA de disodio | 0,100 |
| Lecitina | 0,056 |
| (PEG-7)-trimetilpropanococo-éter | 0,025 |
| Glucosa | 0,008 |
| Extracto de turba | 0,007 |
| Chondrus Crispus (Carragenano) | 0,002 |
| Glicolípidos | 0,000 |

Ejemplo 12

Un ejemplo de ingredientes para otro producto de suero facial que contiene por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo y aceite de semilla de arándano rojo se muestra en la Tabla 7.

5

Tabla 7. Otra composición de suero facial

| INGREDIENTES | % de proporción |
|--|------------------|
| Aqua (Agua) | Añadir hasta 100 |
| Undecilenato de heptilo | 4,000 |
| Metilpropanodiol | 3,000 |
| Glicerina | 3,000 |
| Fenoxietanol | 1,000 |
| Aceite de semillas de arándano rojo | 0,1-5,0 |
| Fracciones F1, F2 , F3 de arándano rojo | 0,01-2,0 |
| Copolímero de acrilato de hidroxietilo/acrilodimetiltaurato de sodio | 0,300 |

| INGREDIENTES | % de proporción |
|---|-----------------|
| Goma de xantano | 0,266 |
| PVP | 0,200 |
| Etilhexilglicerina | 0,200 |
| Propanodiol | 0,163 |
| Copolímero de acrilodimetiltaurato de amonio/VP | 0,150 |
| Caprililglicol | 0,150 |
| Poliisobuteno | 0,150 |
| Cocoato de etilhexilo | 0,100 |
| EDTA de disodio | 0,100 |
| Lecitina | 0,056 |
| (PEG-7)-trimetilolpropanococo-éter | 0,025 |
| Glucosa | 0,008 |
| Extracto de turba | 0,007 |
| Chondrus Crispus (carragenano) | 0,002 |

Ejemplo 13

5 Un ejemplo de un producto de cuidado o acondicionamiento para el cabello. La composición que contiene por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo se muestra en la Tabla 8. Se puede usar aceite de semilla de arándano rojo en productos de cuidado para impartir brillo al cabello y para mejorar la manejabilidad del cabello.

Tabla 8. Una composición de producto de cuidado o acondicionamiento para el cabello.

| INGREDIENTES | % de proporción |
|--|------------------|
| Aqua (agua) | Añadir hasta 100 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,01-2,0 |
| Emulsionante, por ejemplo, cetearth 20 | 0,1-10 |
| Aceites, ceras y/o alcoholes grasos | 0,1-10 |
| Espesantes, por ejemplo, derivados de celulosa | 0,1-10 |
| Tensioactivos catiónicos, por ejemplo, cloruro de cetrimonio | 0,1-15 |
| Aceites de cuidado (por ejemplo, aceite de semilla de arándano rojo) | 0,1-20 |
| Hidratantes, por ejemplo, sorbitol | 0,1-10 |
| Polímeros | 0,1-10 |
| Agentes de conservación, agentes reguladores del pH, Perfume, Color | |

10 Ejemplo 14

Otro ejemplo de un producto de cuidado o acondicionamiento para el cabello. La composición que contiene aceite de semillas de arándano rojo y por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo se muestra en la Tabla

9. El aceite de semilla de arándano rojo se puede usar en productos de cuidado para impartir brillo al cabello y para mejorar la manejabilidad del cabello.

Tabla 9. Otra composición de producto de cuidado o acondicionamiento para el cabello.

| INGREDIENTES | % de proporción |
|---|------------------|
| Aqua (agua) | Añadir hasta 100 |
| Aceite de semillas de arándano rojo | 0,1-5,0 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,01-2,0 |
| Emulsionante, por ejemplo, cetearéth 20 | 0,1-10 |
| Aceites, ceras y/o alcoholes grasos | 0,1-10 |
| Espesantes, por ejemplo, derivados de celulosa | 0,1-10 |
| Tensioactivos catiónicos, por ejemplo, cloruro de cetrimonio | 0,1-15 |
| Aceites de cuidado (por ejemplo, miristato de isopropilo) | 0,1-20 |
| Hidratantes, por ejemplo, sorbitol | 0,1-10 |
| Polímeros | 0,1-10 |
| Agentes de conservación, agentes reguladores del pH, Perfume, Color | |

5 **Ejemplo 15**

Un ejemplo de un producto de cuidado para tratamiento del cuero cabelludo. La composición que contiene por lo menos una de las fracciones F1, F2, y F3 de arándano rojo se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Una composición de producto de cuidado para tratamiento del cuero cabelludo

| INGREDIENTES | % de proporción |
|---|------------------|
| Aqua (agua) | Añadir hasta 100 |
| Etanol | 10-60 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,01-2,0 |
| Agentes hidratantes, por ejemplo, sorbitol | 0,1-10 |
| Agentes de cuidado, por ejemplo, extracto de brotes de enebro | 0,1-20 |
| Agentes de conservación, agentes reguladores del pH, Color, Perfume | |

10

Ejemplo 16

Otro ejemplo de un producto de cuidado para el tratamiento del cuero cabelludo. La composición que contiene aceite de semilla de arándano rojo en combinación con por lo menos una de las fracciones F1, F2 y F3 de arándano rojo se muestra en la Tabla 11. Los productos previstos para cuidado especial son emulsiones o cremas que imparten un efecto de cuidado e hidratación al cuero cabelludo por medio del aceite de semilla de arándano rojo.

15

Tabla 11. Otra composición de producto de cuidado para tratamiento del cuero cabelludo

| INGREDIENTES | % de proporción |
|--------------|------------------|
| Aqua (Agua) | Añadir hasta 100 |
| Etanol | 10-60 |

| INGREDIENTES | % de proporción |
|---|-----------------|
| Aceite de semillas de arándano rojo | 0,1-5,0 |
| Fracciones F1, F2, F3 de arándano rojo | 0,01-2,0 |
| Agentes hidratantes, por ejemplo, sorbitol | 0,1-10 |
| Agentes de cuidado, por ejemplo, extracto de brotes de enebro | 0,1-20 |
| Agentes de conservación, agentes reguladores del pH, Color, Perfume | |

Referencias

- Ek, S., Kartimo, H., Mattila, S. and Tolonen, A. Characterization of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 9834-9842
- 5 Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. and Prior, R. L., High-Throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 4437-4444.
- Kanashiro, A., Souza, J.G., Kabeya, L.M., Azzolini, A.E. and Lucisano-Valim, Y.M. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group, *Z Naturforsch C*, 2007, 62(5-6), 357-361.
- 10 Kylli, P., Berry phenolics: isolation, analysis, identification and antioxidant properties, Academic Dissertation, University of Helsinki, 2011.
- Magalhaes, L. M., Santos, F., Segundo, M.A., Reis, S. and Lima, J.L.F.C. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity, *Talanta*, 2010, 83, 441-447.
- 15 USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.0. Nutrient Data Laboratory Home Page: (<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/flav>). U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2011.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir fracciones de extractos de arándano rojo que contienen compuestos fenólicos, que comprende las etapas de:
 - 5 a) extraer polvo de fibra de arándano rojo seco con etanol para obtener un primer extracto (E1),
 - b) evaporar etanol del primer extracto E1 para obtener una primera fracción (F1),
 - c) extraer la primera fracción (F1) con acetato de etilo para obtener un segundo extracto (E2),
 - d) evaporar acetato de etilo del segundo extracto (E2) para obtener un residuo (ER2) de evaporación,
 - 10 e) extraer el residuo ER2 de evaporación con etanol para obtener un tercer extracto (E3) junto con una capa de lípido, y
 - f) sin retirar la capa de lípido, evaporar etanol y los restos de acetato de etilo para obtener una segunda fracción (F2), o, alternativamente,
 - g) separar el tercer extracto E3 de la capa de lípido, y
 - 15 h) evaporar etanol y los restos de acetato de etilo del tercer extracto (E3) para obtener una tercera fracción (F3).
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que se usan en las extracciones etanol y acetato de etilo sin diluir.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto fenólico es quercetina.
4. Una composición cosmética que comprende sustancias cosméticamente aceptables y, además, dos fracciones ricas en quercetina obtenidas de polvo de fibra de arándano rojo seco con el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
 5. La composición cosmética según la reivindicación 4, en la que dichas dos fracciones ricas en quercetina son las fracciones F1 y F3.
 6. Un método para tratar cosméticamente la piel de un sujeto humano, que comprende la etapa de aplicar tópicamente a la piel una cantidad cosméticamente efectiva de la composición cosmética según la reivindicación 4 o 5.
 7. El método según la reivindicación 6, en el que la composición cosmética a aplicar a la piel tiene efectos antienvjecimiento.
 8. El método según la reivindicación 6, en el que la composición cosmética a aplicar a la piel tiene un papel protector contra la degradación del colágeno de tipo II.
 9. La composición cosmética según la reivindicación 4 o 5 para uso en un método para promover el mecanismo de reparación génica después del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.

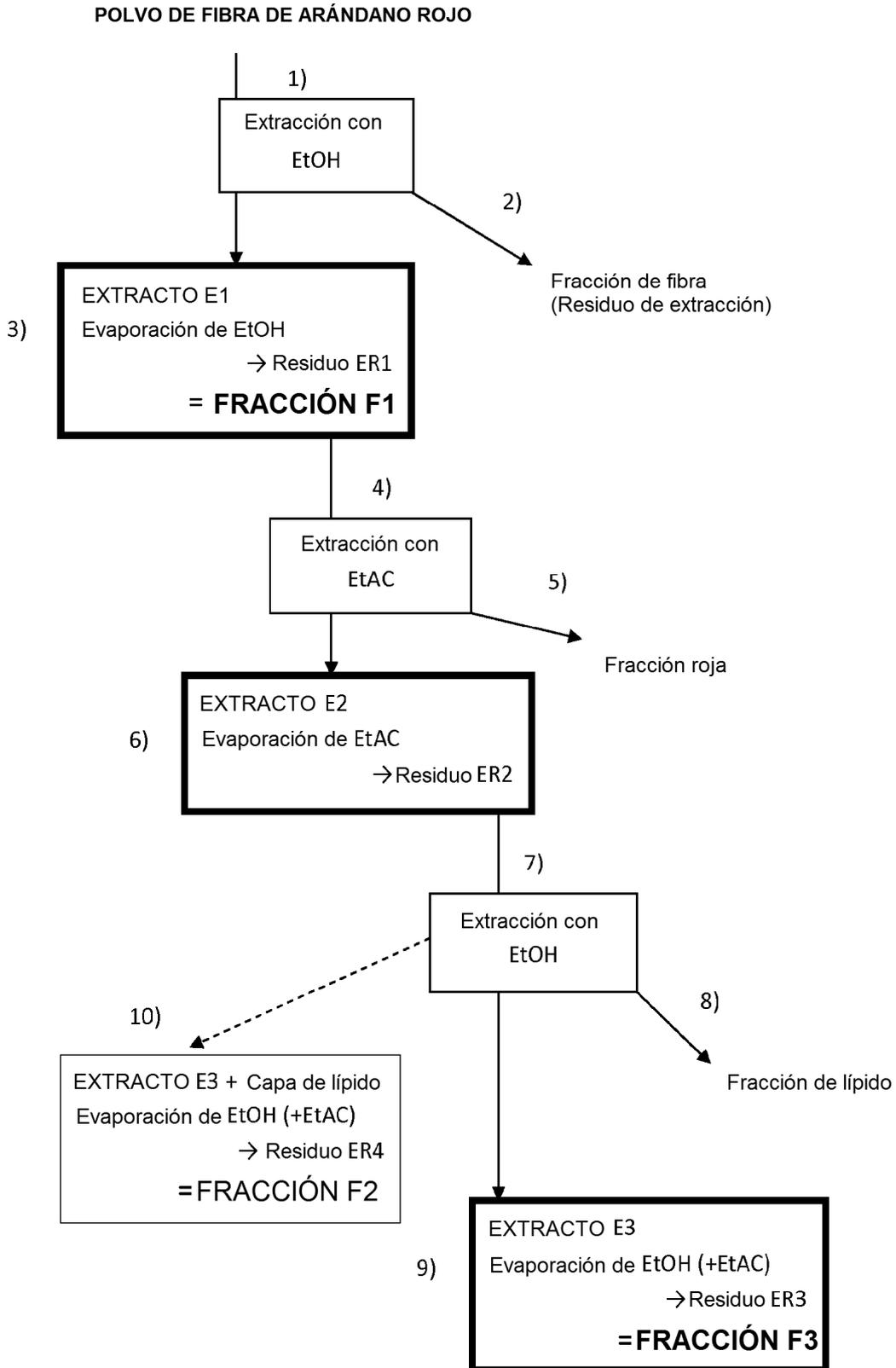


Fig. 1

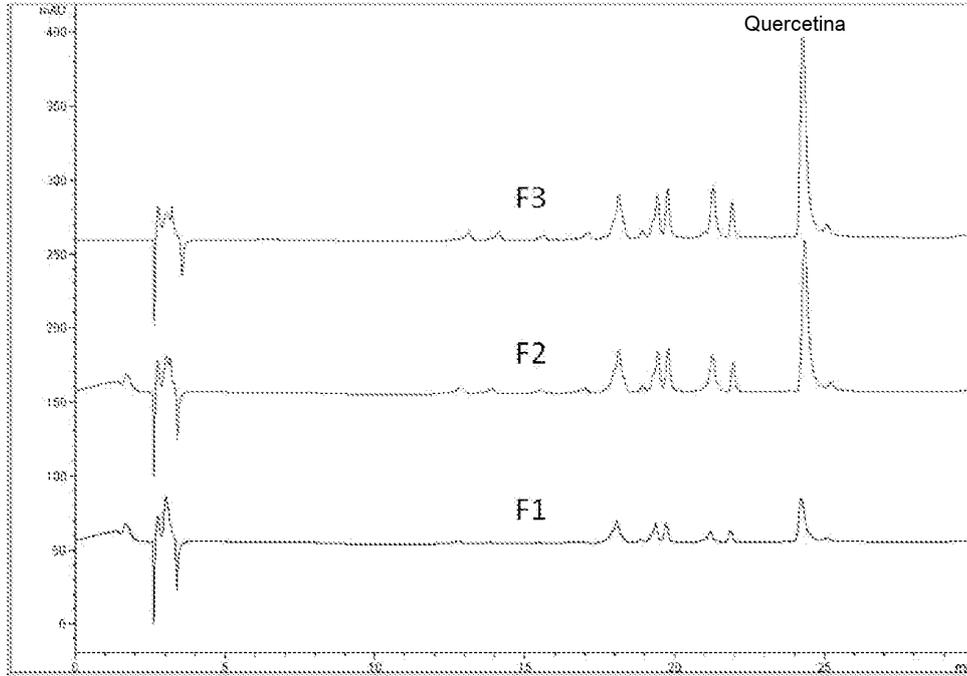


Fig. 2