

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 488**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 8/49</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/97</b>	(2007.01)
<b>A61Q 5/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 36/185</b>	(2006.01)
<b>A61K 36/73</b>	(2006.01)
<b>A61K 36/87</b>	(2006.01)
<b>A61K 36/45</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 36/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2010 PCT/GB2010/050790**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10131049**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010 E 10763405 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2477597**

54 Título: **Tintes naturales para el cabello**

30 Prioridad:

**15.05.2009 GB 0908397**

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

**11.02.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LEEDS (100.0%)  
Leeds West Yorkshire LS2 9JT, GB**

72 Inventor/es:

**BLACKBURN, RICHARD SIMON;  
ROSE, PAUL MARTIN y  
RAYNER, CHRISTOPHER MARK**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 699 488 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**

Tintes naturales para el cabello

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la coloración del cabello humano, y a la provisión de tintes para tales aplicaciones. Más particularmente, la invención se refiere a tintes que se obtienen a partir de productos naturales, y a su uso en tales aplicaciones.

Antecedentes de la invención.

10 La coloración semipermanente del cabello es una actividad cada vez más significativa a nivel mundial, ya que el número de personas que usan colorantes para el cabello, tanto en salones profesionales como en sus propios hogares, aumenta a un ritmo acelerado. Sin embargo, debido a la naturaleza química de muchos tintes para el cabello, los usuarios de estos productos están expuestos a riesgos significativos para la salud, y habría claros beneficios para aquellos que sí se aplican los colorantes para el cabello, o se someten a tratamientos profesionales para teñir el cabello, en el desarrollo de productos y métodos de aplicación alternativos naturales, no tóxicos, no cancerígenos, que minimizarían cualquier peligro potencial para la salud humana.

15 Muchos tintes para el cabello comerciales se derivan sintéticamente de materias primas de petróleo, y su fabricación a menudo implica el manejo de productos intermedios peligrosos y el consumo de grandes volúmenes de disolventes a base de petróleo. Adicionalmente, las técnicas actuales de coloración del cabello por lo general implican el desperdicio de hasta el 95% del color aplicado, que se descarga así a la corriente de agua. Claramente, por lo tanto, habría un beneficio considerable en el desarrollo de colorantes biodegradables, extraídos de fuentes naturales, e implicando el uso de tecnologías benignas.

20

Previamente, ha habido interés en varios colorantes que aparecen en productos naturales, y una clase que ha recibido cierta atención es el grupo de polifenoles conocidos como antocianinas. Están disponibles diversos documentos de la técnica anterior que enseñan el uso de estos materiales en productos cosméticos.

25 Así, por ejemplo, el documento PL-B-192692 enseña un método de obtención de tintes de antocianina y recuperar los tintes de desechos de producción de plantas. Específicamente, la patente describe la extracción de tintes de antocianinas de frutas coloreadas, como moras azules, rosas negras y aronia negra, y su posterior purificación y uso en productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos. Se proporciona un método específico para el tratamiento previo de la fruta, y su extracción y posterior purificación por adsorción/desorción. Sin embargo, los autores no ofrecen ninguna mención específica de otras fuentes de fruta, y tampoco hay ninguna referencia al uso del producto, o de cualquier formulación relacionada.

30

El sitio web de un productor/proveedor de cosméticos de EE. UU., Act by Nature LLC (<http://actbynature.com/>), anuncia una variedad de colorantes naturales para el cabello, que incluyen "revolutionary patent pending natural permanent hair colour, colouring tints, and colour enhancing solutions made using 100% plant derived dyes". Sin embargo, se proporciona información técnica limitada con respecto a la naturaleza de estos tintes, aunque hay disponible una lista general de ingredientes para formulaciones de tintes para el cabello, y esta lista incluye antocianinas entre los ingredientes clave. Sin embargo, no se proporciona más información.

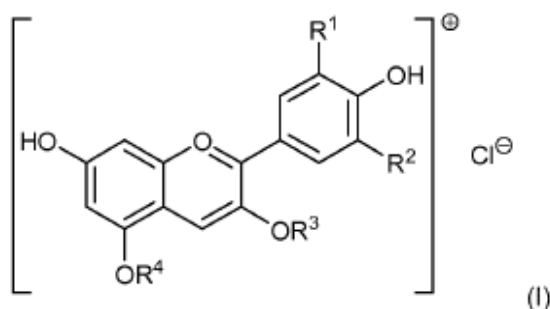
35

El documento US-A-2006/246025 se refiere a composiciones fijadoras de cabello de secado rápido naturales que comprenden polisacáridos, pero se refiere principalmente a sistemas de administración basados en polisacáridos que comprenden una combinación de un polisacárido lineal tal como pululano y un alcohol monohídrico, e incluye sin referencia a cualquier sistema de coloración.

40

El documento JP-A-62153211 se refiere al uso de antocianinas en productos para el cuidado del cabello, y describe preparaciones para el cabello que contienen antocianinas para el control de la caspa. Sin embargo, parece que la acción de los ingredientes de antocianina descritos está específicamente en el control de la caspa en los tónicos para el cabello descritos, ya que no se hace mención de la actividad de teñido. Se describen estructuras específicas de antocianinas (I), aunque el documento no dice nada sobre la fuente de la fruta y los métodos de extracción y purificación.

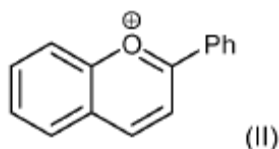
45



Las preparaciones para el cabello descritas para el control de la caspa contienen al menos un compuesto seleccionado de antocianinas (I) (en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son independientemente H, OH o MeO; R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente H o 3-glucósido). Se añaden polioxietileno oleil alcohol éter, delphinidina y una fragancia al etanol y la fase alcohólica se añade al agua que contiene glicerina para dar un tónico capilar.

El documento US-B-6620410 enseña composiciones para el cuidado del cabello que están diseñadas para proporcionar una mayor protección contra la radiación ultravioleta. Las formulaciones descritas comprenden extracto de piel de uva, y se afirma que muestran propiedades de radiación anti-UV. Se cree que el extracto de piel de uva inevitablemente contendrá antocianinas, aunque el documento no contiene una divulgación específica de antocianinas ni de ninguna otra fuente de antocianinas; además, la patente no enseña ni sugiere el uso de ningún extracto para la coloración del cabello.

El documento US-B-6241785 se refiere a compuestos de tipo flavilio y su uso en el teñido de fibras queratínicas, con un énfasis particular en el cabello humano. Estos derivados son miembros de una clase química a la que pertenecen las antocianinas. Sin embargo, los compuestos descritos se obtienen sintéticamente, y no a través de la extracción de fruta. Adicionalmente, la patente especifica los compuestos (II) que tienen patrones de sustitución particulares, excluyendo así las antocianinas.



El documento JP-A-4119179 enseña un compuesto de antocianina específico - cianidina 3-O-arabinósido - para uso en teñir lana en combinación con quercetina glucouronida. Sin embargo, aunque el documento enseña la formulación del tinte, no se proporciona información con respecto a la fuente de la antocianina, o su recuperación. Adicionalmente, la patente se refiere al teñido de una fibra, con mención específica de la seda y la lana, y requiere condiciones de teñido de pH ≤ 2.5 combinadas con una temperatura de 95 °C, durante 1 hora, condiciones que serían totalmente inadecuadas para el teñido de cabello humano. A pesar de su uso propuesto como tinte, el documento no menciona la aplicación del material al cabello, ni tampoco su uso en ninguna aplicación cosmética.

El documento US-A-2007/0251024 enseña la aplicación de colorantes naturales al cabello en un procedimiento que requiere la inclusión de un agente de mordiente, tal como una sal mineral o metálica, en el procedimiento de teñido del cabello. Los inventores describen la inclusión del mordiente para proporcionar sustentividad entre el tinte y la fibra capilar, deduciendo que en ausencia del teñido mordiente no sería posible ya que la afinidad limitada de los tintes no permitiría una acumulación suficiente de color en la fibra del cabello. La invención reivindicada es, en muchos sentidos, análoga a los procedimientos de teñido de lana de siglos de antigüedad que requieren la aplicación de tintes naturales con un mordiente. Sin embargo, el documento no contiene ninguna sugerencia de la aplicación de polifenoles naturales como colorantes sin un mordiente.

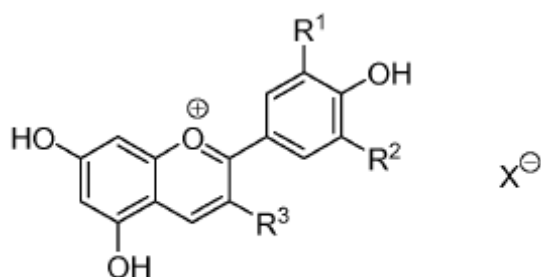
La literatura proporciona algunos ejemplos relacionados con el teñido de fibras textiles con tintes a base de antocianinas, aunque ha habido informes recientes sobre la aplicación exitosa de un extracto acuoso de orujo de uva para teñir el algodón pretratado con mordiente con taninos e hilados de lana blanqueada, en cada caso se obtienen tonos rojo/violeta. Los teñidos en este estudio se realizaron mediante métodos de agotamiento, empleando baños de tinte acuosos con o sin sal de metal (o tanino) y mordiente añadido a la solución.

La creciente demanda de tintes para uso en el teñido del cabello humano que están libres de peligros potenciales para la salud ha presentado una oportunidad para que los fabricantes exploren tintes tales como antocianinas, que están disponibles de fuentes naturales a través de tecnologías limpias, para tales propósitos. Sin embargo, en la actualidad no existe un procedimiento comercial satisfactorio para la producción de tintes de esta manera. Por lo tanto, los presentes inventores han investigado la producción de colorantes a partir de fuentes naturales y han

desarrollado una gama de compuestos naturales y métodos para su producción, que facilitan la producción de tintes para el cabello seguros y comercialmente viables.

Resumen de la invención

5 La presente invención se refiere a la extracción y purificación selectiva de materiales polifenólicos específicos de fuentes botánicas particulares, en particular frutas de grosella negra (*Ribes nigrum*), mora (*Rubus*), moras azules, arándano, arándano rojo (*Vaccinium*), uva (*Vitis*), aronia (*Aronia*), baya de Saskatoon (*Amelanchier alnifolia*), espino amarillo (*Hippophae rhamnoides*), morera (*Morus*), acai (*Euterpe*), cereza (*Prunus*), col roja (*Brassica oleracea*) e higos (*Ficus*) o jugos prensados, y su aplicación en formulaciones como tintes semipermanentes para cabello humano. De este modo, según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la coloración semipermanente del cabello humano, comprendiendo dicho método tratar el cabello humano con una mezcla de tinte comprendida en una formulación, en el que dicha mezcla comprende una multiplicidad de materiales polifenólicos, en el que dichos materiales se obtienen de una fuente botánica; en el que dichos materiales polifenólicos comprenden compuestos de antocianina y dichos compuestos de antocianina son antocianidinas de aglicona o antocianinas glicosiladas de fórmula (III):



(III)

15 en el que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son, independientemente, H, OH u OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> es OH (antocianidinas de aglicona) o un grupo O-glicosilo (antocianinas glicosiladas), y X es un contraión que se puede seleccionar opcionalmente de cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bisulfato, carbonato, bicarbonato, citrato, formiato, acetato o tartrato, en el que dicha formulación es un champú y/o un acondicionador; en el que dicha formulación comprende concentraciones de dichas antocianinas de entre 0.01 y 0.40% en peso de la formulación; y en el que dicha formulación proporciona un efecto de "plateado".

Esta divulgación incluye una mezcla de tinte para la aplicación al cabello humano, en el que dicha mezcla comprende una multiplicidad de materiales polifenólicos, en el que dichos materiales se obtienen de una fuente botánica.

25 Más preferiblemente, dichos compuestos de antocianina son antocianidinas agliconas o antocianinas glicosiladas. Más preferiblemente, dichos compuestos de antocianina son antocianinas glicosiladas en las que dicha glicosilación comprende un monosacárido o disacárido.

Los ejemplos específicos de antocianidinas de aglicona incluyen los siguientes:

Tabla 1 Composición química de las antocianidinas de aglicona de estructura (III)

Nombre	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Pelargonidina	H	H	OH
Cianidina	OH	H	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	OH
Delfinidina	OH	OH	OH
Petunidina	OH	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH

30

Los compuestos de antocianina activos pueden comprender diversos grupos O-glicosilo como el grupo R<sub>3</sub>, por ejemplo monosacáridos o polisacáridos, tales como disacáridos o trisacáridos. Opcionalmente, estas unidades estructurales de glicosilo pueden incluir una sustitución de acilo adicional, proporcionando así una multitud de antocianinas de origen natural. Los grupos monosacáridos preferidos incluyen O-glucósido, O-ramósido, O-arabinósido, O-xilosido y O-galactósido. Los di- y trisacáridos preferidos son por lo general combinaciones de estos grupos monosacáridos, por ejemplo O-rutinósido (glucosa + ramnosa), O-soforósido (glucosa + glucosa) y O-primeverósido (glucosa + xilosa). Debido a la naturaleza de las rutas biosintéticas asociadas de la formación de antocianinas, las fuentes botánicas particulares contienen combinaciones específicas de antocianinas múltiples. De hecho, las frutas particulares y, de hecho, las variedades dentro de las especies, tienen perfiles específicos y característicos de antocianinas, dando lugar a variaciones en el color observado. Por ejemplo, las cuatro principales antocianinas presentes en la fruta de grosella negra son cianidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-rutinósido, delphinidina-3-O-glucósido y delphinidina-3-O-rutinósido, y estos derivados representan > 97% del total de antocianinas en el fruto.

Una vez aisladas, el color observado de las antocianinas está influenciado por el ambiente químico, particularmente los efectos solvatocromáticos y el pH, y esto permite el control de color potencial en formulaciones que incorporan estos compuestos.

De este modo, en una realización especialmente preferida, la presente invención proporciona mezclas altamente específicas de antocianinas particulares, y estas mezclas se obtienen mediante técnicas específicas de extracción/fraccionamiento/purificación/concentración y se originan a partir de fuentes botánicas particulares. Se encuentra que estas mezclas altamente específicas de antocianinas se adsorben a la queratina humana cuando se aplican a través de un baño de tinte acuoso, o cuando se incorporan a una formulación de base común, tal como una base tipo champú o acondicionador, u otra base apropiada para la aplicación cosmética. Las antocianinas particulares y, de hecho, las mezclas específicas de las mismas, se pueden definir más convenientemente en términos de sus perfiles cromatográficos de HPLC característicos.

Esta divulgación incluye un método para la preparación de las mezclas de colorantes analizadas anteriormente, comprendiendo dicho método la extracción de dichos colorantes de al menos una fuente botánica y la purificación de dicho material extraído.

Preferiblemente, dicha fuente botánica es fruta o jugo de fruta prensado. Más preferiblemente, dicha fruta se selecciona de grosellas negras, moras, moras azules, arándanos, arándanos rojos, uvas, aronia, bayas de Saskatoon, espino amarillo, morera, acai, cerezas y/o higos.

Esta divulgación incluye una formulación para el tratamiento de cabello humano, en la que dicha formulación comprende al menos una mezcla de tinte mencionada anteriormente.

Esta divulgación incluye el uso de las mezclas de colorantes y las formulaciones mencionadas anteriormente para el teñido de fibras queratínicas. Preferiblemente dichas fibras queratínicas comprenden cabello humano.

Preferiblemente, el cabello se puede lavar con agua antes de dicho tratamiento con mezclas de tinte. Opcionalmente, dicho procedimiento de lavado también se puede realizar con champú. Opcionalmente, dicho procedimiento de lavado puede ser seguido por un tratamiento con acondicionador para el cabello.

Varios informes publicados han proporcionado datos toxicológicos relacionados con antocianinas que corroboran la opinión de que estos pigmentos no representan una amenaza para la salud humana. De hecho, las principales fuerzas impulsoras para los estudios continuos relacionados con estos compuestos son proporcionadas por las propiedades terapéuticas o medicinales demostradas de los materiales, incluida la actividad antioxidante, la actividad antiinflamatoria y la reducción de la enfermedad coronaria, así como las propiedades anticancerígena y antimutagénica.

Estos atributos particularmente positivos de este grupo particular de polifenoles hacen que los compuestos de antocianina sean materiales especialmente apropiados para su inclusión en productos para el cuidado personal, tales como colorantes para el cabello.

#### Descripción de la invención

Los presentes inventores han extraído con éxito las mezclas de derivados de polifenol de frutas o zumos de fruta apropiados, y los extractos se han purificado para obtener tintes apropiados para la aplicación en el cabello humano. De este modo, a diferencia de la técnica anterior, la presente divulgación proporciona la preparación de los tintes de antocianina a partir de materiales disponibles naturalmente, esto es, frutas, en la que los tintes están en una forma apropiada para su aplicación como tintes para el cabello.

Las muestras de fruta seca, jugo prensado y orujo de fruta se han obtenido con éxito y los inventores han podido establecer una cadena de suministro apropiada de volumen y calidad apropiados. Se llevaron a cabo análisis de extractos de diversas variedades de grosellas negras, moras, moras azules, arándanos, aronia, morera así como, col roja, y los resultados analíticos confirmaron los perfiles de antocianinas sugeridos anteriormente en la literatura.

Se obtuvieron cromatogramas de HPLC que resaltaron la presencia y las proporciones características de las antocianinas específicas en cada material fuente.

5 El mecanismo de coloración es por adsorción de las antocianinas al cabello. Para investigar completamente el tipo de asociación e interacción, se realizaron estudios de sorción exhaustivos, y los resultados del análisis de datos asociados permitieron a los inventores demostrar un patrón de isoterma de tipo Freundlich. Un análisis adicional de los datos facilitó la optimización del perfil de antocianinas en relación con las características específicas de la glicosilación, que se consideró necesaria para el teñido con éxito y controlado del cabello

10 Se observó una adsorción preferencial con ciertas especies; por ejemplo, se encontró que un perfil de extracto purificado que contiene componentes de antocianina con las unidades estructurales de azúcar más pequeñas posibles (monosacáridos, por ejemplo, glucósido) se absorbe preferentemente al cabello cuando se compara con especies de antocianinas que tienen unidades de glicosilo más grandes (disacáridos, por ejemplo, rutinósido).

15 El método implica la extracción de los tintes de una fuente botánica y la posterior purificación de los tintes extraídos. Por lo general, la extracción se logra mediante la acción de medios acuosos, preferiblemente agua, con o sin la aplicación de calor. De este modo, si la fuente botánica es fruta, los tintes se pueden extraer convenientemente calentando la fruta en agua. Opcionalmente, dichos medios acuosos pueden comprender adicionalmente glicerol o etanol y se pueden acidificar a pH <4 mediante la adición de cualquiera de, por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, acético, trifluoroacético, ascórbico, cítrico, fórmico, láctico, tartárico, alcanfor-10-sulfónico u oxálico.

20 Una etapa clave del método es el procedimiento de purificación posterior, que requiere el aislamiento de los tintes del extracto crudo o jugo de fruta en la dilución correcta. Los métodos apropiados para lograr esto incluyen técnicas de adsorción/desorción usando diversos sólidos porosos y/o resinas. Se lograron resultados exitosos con polímeros de ésteres acrílicos alifáticos no iónicos, materiales proteínicos, polisacáridos y variantes modificadas de los mismos. Tras la eliminación de componentes extraños no deseados, los compuestos diana se pueden eluir en una fase líquida etanólica. Opcionalmente, dichos medios de elución pueden comprender adicionalmente glicerol o alcohol isopropílico, junto con el calentamiento, por lo general a 20-100 °C, y ser ligeramente acidificados mediante la adición de cualquiera de, por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, acético, trifluoroacético, ascórbico, cítrico, fórmico, láctico, tartárico, alcanfor-10-sulfónico u oxálico (0.01-1.0M).

25 La solución eluida de antocianinas luego se puede pulverizar en polvo después de la eliminación del solvente por evaporación o por técnicas comunes de formación de polvo tales como recristalización o secado por pulverización, o por cualquier otra técnica similar para producir un polvo. Alternativamente, se puede usar una solución líquida concentrada para la incorporación adicional en formulaciones de tinte.

30 El método de la invención usa formulaciones de los tintes semipermanentes descritos anteriormente. Hay dos consideraciones principales a este respecto, la primera de las cuales es el sistema de administración, en el que el tinte activo se ha incorporado con éxito en formulaciones de bases de tipo champú y acondicionador. Es posible una mayor personalización del sistema de administración de base de colorante para controlar la estabilidad y el color de la formulación y maximizar la cantidad de tinte activo disponible.

35 El segundo aspecto que requiere consideración es la especificación precisa del perfil de tinte activo, que afecta directamente el color observado en el cabello. Este se ve claramente afectado por el material de origen botánico, incluida la variedad particular que se emplea, y el método específico de extracción, purificación y fraccionamiento. Por ejemplo, los polifenoles glicosilados son sensibles al calor y la acidificación que resulta en la hidrólisis de los grupos glicosilo. Por lo tanto, se tomó el debido cuidado para desarrollar métodos de aislamiento que preserven la glicosilación de los compuestos en su forma natural.

40 Se prestó la debida atención a la producción de mezclas de antocianinas con diferentes extractos naturales purificados en diversas formulaciones con el fin de crear perfiles personalizados que demostraron proporcionar una gama apropiada de colores disponibles, especialmente los caobas y los marrones claros y oscuros. Las variaciones de tales tonos individuales se lograron usando nuestro sistema mediante el teñido a partir de una base de formulación única que contiene la mezcla estabilizada de componentes de tinte, a temperatura ambiente, en ausencia de cualquier especie oxidativa, sales metálicas o cualquier componente que actúe como mordiente.

45 La atención de los inventores se ha dirigido hacia los tintes de antocianinas, y los inventores han estudiado especialmente la aplicación de antocianinas purificadas extraídas de pieles de grosellas negras secas. El perfil de antocianinas del extracto se midió cuantitativamente mediante el uso de una metodología de HPLC calibrada y, a partir de los cromatogramas adquiridos, fue posible obtener datos precisos relacionados con la presencia de antocianinas particulares en el baño de tinte.

50 De este modo, por ejemplo, los estudios de adsorción isotérmica se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20 °C) usando baños de tinte acuosos regulados (citrato de sodio/ácido cítrico pH 2.0-5.5; 0.01-0.50M) de concentración variada de antocianina. Los cromatogramas de HPLC se registraron para las muestras de los baños de tinte antes y después del teñido del cabello humano. Las muestras de cabello usadas en el estudio procedían de muestras de

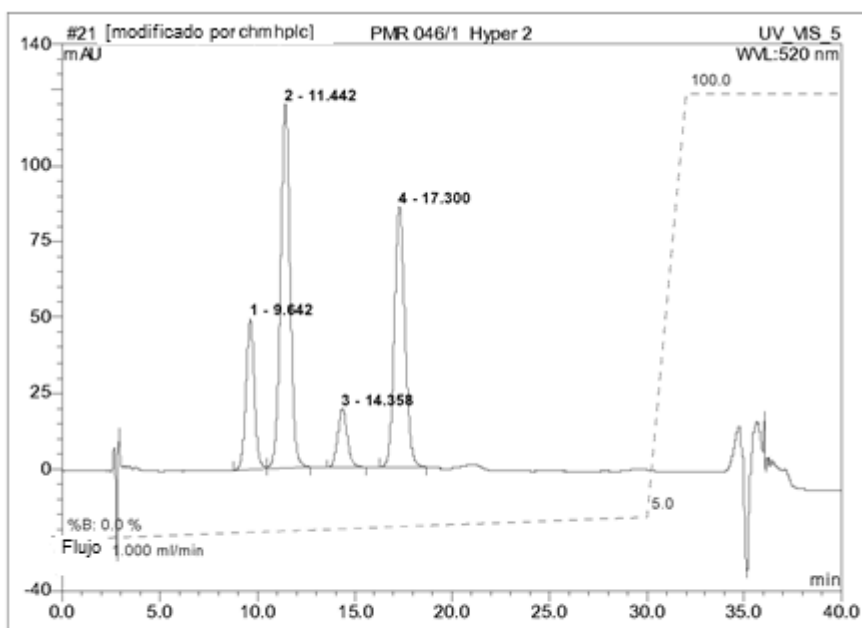
cabello humano rubio decolorado, que se lavaron con champú y se enjuagaron antes de la inmersión en el baño de tinte.

5 Un ejemplo de cromatograma de baño de tinte se muestra en la figura 1, con sus datos asociados que se colocan en la tabla 1. El cromatograma muestra claramente la presencia de las cuatro antocianinas principales características del extracto de grosella negra, que son delfinidina-3-O-glucósido ( 15.71%), delfinidina-3-O-rutinósido (43.25%), cianidina-3-O-glucósido (7.03%) y cianidina-3-O-rutinósido (34.00%) en un baño de tinte acuoso que tenía un contenido total de antocianina de 256 mg dm<sup>-3</sup>.

Tabla 2 Datos de HPLC del baño de tinte antes del teñido. \* Del = delfinidina, Cy = cianidina, Glu = glucósido, Rut = rutinósido, Rel. = Relativo, Amt. = Cantidad

No.	Tiempo de retención min	Nombre*	Área mAU*min	% de área relativo	Cantidad mg dm <sup>-3</sup>	Amt. Rel. Mol%
1	9.64	Del-3-O-Glu	24.912	15.71	40.05	18.67
2	11.44	Del-3-O-Rut	68.573	43.25	110.25	39.81
3	14.36	Cy-3-O-Glu	11.139	7.03	19.41	9.38
4	17.30	Cy-3-O-Rut	53.909	34.00	86.67	32.14
Total:			158.532	100.00	256.37	100.00

10



**Figura 1** Cromatograma de HPLC de antocianinas de grosella negra purificadas

15 El análisis de los datos de HPLC para el baño de tinte después del teñido muestra claramente que todas las antocianinas fueron absorbidas por el cabello, ya que se observa que las concentraciones de cada uno se reducen, como se puede véanse en los datos de la tabla 2. La preferencia por las antocianinas con unidades estructurales de azúcar más pequeñas unidades se puede véanse mediante el análisis de los datos de agotamiento en la tabla 2 (% en moles).

El porcentaje de agotamiento es una representación de la cantidad de cada tinte constituyente (antocianina) que se eliminó del baño de tinte durante el procedimiento de teñido. Debido a la naturaleza de los sistemas y métodos

usados, esto equivale directamente a la cantidad de tinte que se ha absorbido en la fibra (queratina). Como consecuencia del nivel de detalle adquirido con la metodología de HPLC, es posible determinar los valores de porcentaje de agotamiento para antocianinas individuales y también para la mezcla general. Cuanto mayor sea el porcentaje de agotamiento, mayor será la cantidad de tinte (antocianina) que se ha eliminado del baño de tinte.

- 5 En este ejemplo, se observó que las antocianinas glucosídicas (monosacáridas) (Del-3-O-glu y Cy-3-O-glu) se absorbieron aproximadamente con el mismo agotamiento (28.74 y 29.71% respectivamente), mientras que aquellos con residuos de rutinósido (disacáridos) (Del-3-O-rut y Cy-3-O-rut) fueron absorbidos con un agotamiento muy reducido (12.25 y 11.64%), pero también comparables entre sí.

10 Tabla 3 Datos de HPLC del baño de tinte después de teñir el cabello humano. \* Del = delfinidina, Cy = cianidina, Glu = glucósido, Rut = rutinósido, Rel. = Relativo

No.	Tiempo de retención (min)	Nombre *	Área (mAU x min)	Área Rel. (%)	Conc. (mg dm <sup>-3</sup> )	Cantidad Rel. (% en moles)	Agotamiento (%)
1	9.62	Del-3-O-Glu	17.752	13.18	28.54	13.24	28.74
2	11.51	Del-3-O-Rut	60.175	44.68	96.74	44.89	12.25
3	14.43	Cy-3-O-Glu	7.829	5.81	13.64	6.33	29.71
4	17.42	Cy-3-O-Rut	47.634	35.37	76.58	35.54	11.64
Total:			133.390	99.04	215.50	100.00	16.77

- 15 En experimentos adicionales, la coloración exitosa del cabello se logró usando diferentes concentraciones de las mismas mezclas de antocianinas de grosella negra en un número de experimentos de baño de tinte, usando una técnica de isoterma de adsorción. De esta manera, se encontró que existían relaciones directas, reproducibles y cuantificables entre las concentraciones previas y posteriores al baño, el agotamiento y el tinte en la fibra.

Se realizó un estudio de isoterma de adsorción, controlado mediante el análisis de los espectros UV-Vis de cada baño de tinte. Los parámetros para el estudio se detallan en la tabla 4.

Tabla 4 Parámetros de isoterma de adsorción

Artículo	Parámetro
Tinte	Extracto de antocianina de grosella negra
Sustrato	Rubio claro (cabello decolorado)
Cantidad de sustrato	100 mg
Pretratamiento del sustrato	Enjabonado con champú
Solvente	solución reguladora Ácido cítrico/citrato 0.2 M
Volumen del solvente	5.0 ml



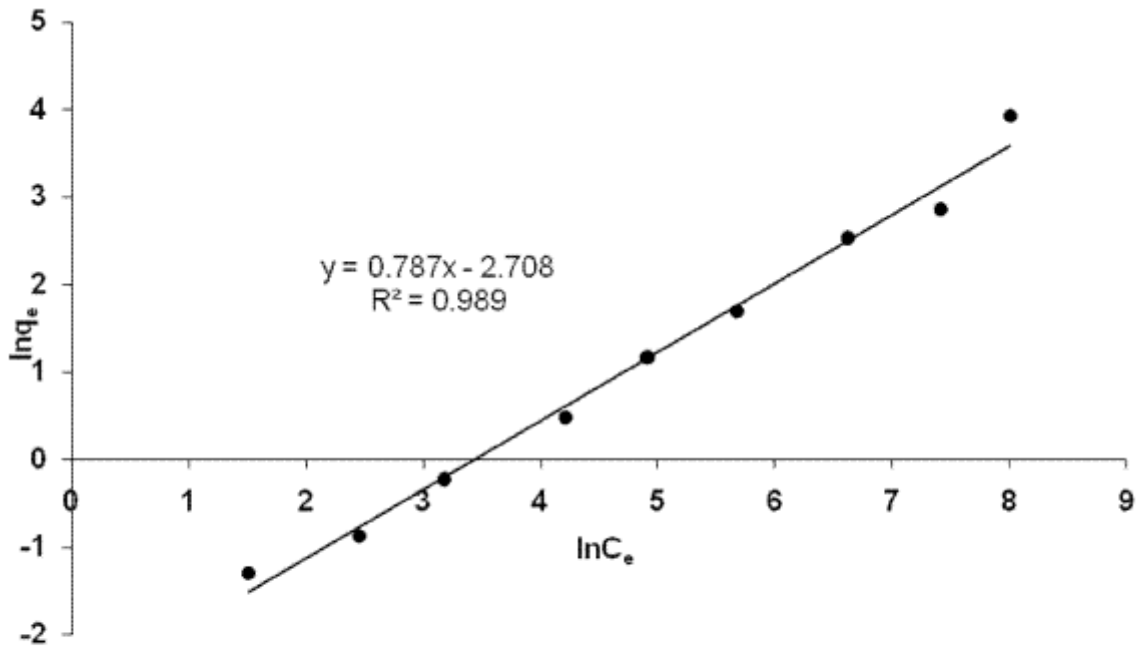
## ES 2 699 488 T3

Solvente: sustrato	50:1 (volumen:peso)
Temperatura	20°C
Duración	1 hora
Agitación	Agitada

Tabla 5

Entra da	*omf %	$C_0$ mg dm <sup>-3</sup>	Agotamiento %	$C_e$ mg dm <sup>-3</sup>	$q_e$ mg g <sup>-1</sup>
1	20.00	4000	25.5	2989.4	50.5
2	10.00	2000	17.4	1651.5	17.4
3	5.00	1000	23.2	749.1	12.6
4	2.00	400	23.6	291.2	5.4
5	1.00	200	25.5	136.1	3.2
6	0.50	100	24.2	67.6	1.6
7	0.20	40	30.6	24.1	0.8
8	0.10	20	30.6	11.7	0.4
9	0.05	10	44.4	4.5	0.3

Resultados isoterma de adsorción, medidos por absorbancia UV-Vis. \* omf = en masa de fibra



**Figura 2** Isoterma de adsorción de extracto de antocianinas de grosella negra purificadas en cabello humano rubio claro, analizado por UV-Vis

Los datos obtenidos, como se expone en la tabla 5 anterior, mostraron una buena relación entre la concentración y la sorción. Como era de esperar, las soluciones de menor concentración dieron un agotamiento casi completo, y las concentraciones más altas mostraron un agotamiento reducido. Estos datos se extrapolaron aún más, con gráficos logarítmicos de  $C_e$  (concentración de equilibrio en solución,  $\text{mg dm}^{-3}$ ) contra  $q_e$  (concentración de equilibrio en fibra,  $\text{mg g}^{-1}$ ). Se observó una relación de línea recta en la gráfica resultante (como se muestra en la figura 2,  $\ln C_e$  vs  $\ln q_e$ , arriba,  $R^2 = 0.990$ ), de acuerdo con la descripción de la isoterma de Freundlich.

**Ecuación 1** 
$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n_F} \ln C_e$$

La isoterma de Freundlich sugiere que la energía de sorción disminuye exponencialmente al completar los centros de separación de un adsorbente, donde  $K_F$  es la constante de Freundlich ( $\text{dm}^3 \text{g}^{-1}$ ),  $n_F$  es la constante de afinidad y  $1/n_F$  es el factor de heterogeneidad. Por lo tanto, una gráfica de  $\ln q_e$  versus  $\ln C_e$  debe producir una línea recta de valor de intersección  $\ln K_F$  y pendiente  $1/n_F$  si la isoterma obtenida a través de un experimento observa la expresión de Freundlich. Si  $n_F > 1$ , entonces la adsorción es favorable. En el experimento descrito anteriormente, la intersección = -2.704, por lo tanto  $K_F = 0.066 \text{ dm}^3 \text{g}^{-1}$ , y el gradiente = 0.7871, por lo tanto  $n_F = 1.27$ .

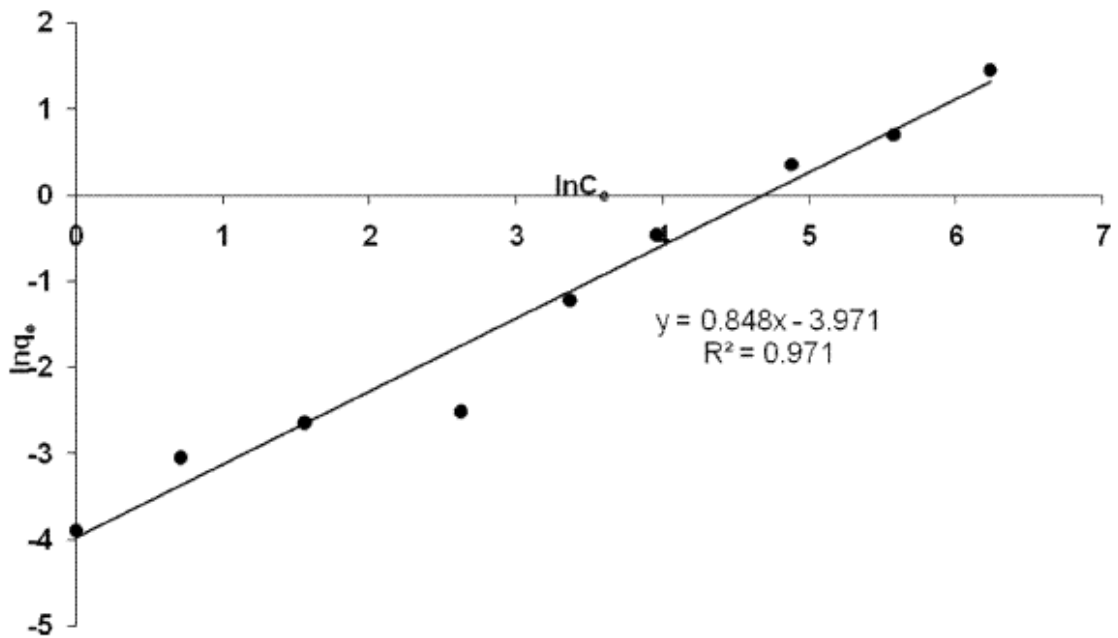
El estudio de adsorción se repitió usando cromatogramas de HPLC para asignar concentraciones, en lugar de absorbancia UV-Vis. Todos los parámetros experimentales se mantuvieron, y el método de HPLC se calibró con cloruro de cianidina-3-O-glucósido y cloruro de cianidina-3-O-rutinósido como estándares.

Los resultados del análisis de HPLC se usaron para asignar concentraciones, en lugar de absorbancia UV-Vis, con el fin de obtener información más precisa con respecto a los componentes individuales de antocianina del extracto.

Tabla 6 Resultados de isoterma de adsorción, medidos por HPLC, para antocianinas totales

Entrada	omf* %	$C_0 \text{ mg dm}^{-3}$	Agotamiento %	$C_e \text{ mg dm}^{-3}$	$q_e \text{ mg g}^{-1}$
1	20.0	4000	14.4	509.3	4.28

2	10.0	2000	13.3	264.1	2.03
3	5.0	1000	17.8	131.8	1.43
4	2.0	400	19.5	52.4	0.63
5	1.0	200	17.1	29.0	0.30
6	0.5	100	10.6	13.8	0.08
7	0.2	40	23.2	4.8	0.07
8	0.1	20	32.0	2.0	0.05
9	0.05	10	29.2	1.0	0.02



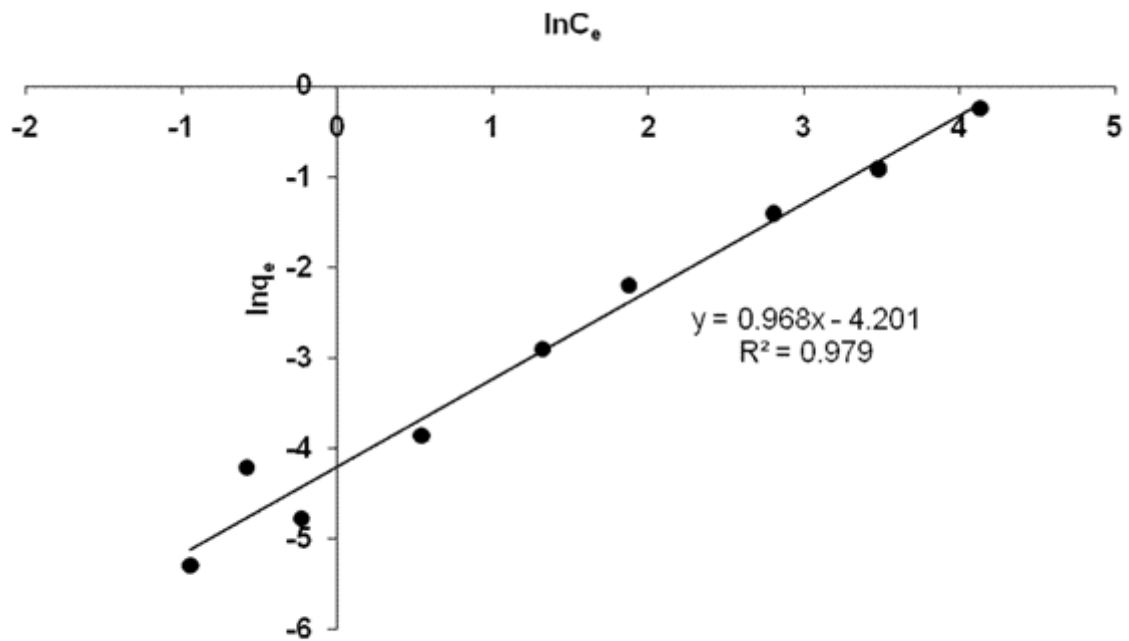
**Figura 3** Isoterma de adsorción de extracto de antocianinas de grosella negra purificadas en cabello humano, analizado por HPLC, que muestra las antocianinas totales

5 Cuando se aplicó la ecuación 1 a este conjunto de datos, considerando la composición total de antocianinas, nuevamente se observó una excelente relación de línea recta ( $R^2 = 0.972$ ). El intercepto = -3.9713, por lo tanto,  $K_F = 0.019 \text{ dm}^3 \text{ g}^{-1}$ , y el gradiente = 0.8487, por lo tanto,  $n_F = 1.17$ . Este valor de  $n_F$  está en buena concordancia con el resultado obtenido del experimento controlado con UV-Vis inicial, descrito anteriormente ( $n_F = 1.27$ ).

10 Este conjunto de datos se analizó basándose en el contenido total de antocianinas detectado por HPLC (área calibrada bajo picos). Sin embargo, cada pico en el cromatograma se resolvió completamente y se caracterizó como los componentes individuales de antocianina mediante el uso de estándares y confirmado por la literatura. Por lo tanto, el conjunto de datos se analizó más a fondo para considerar los componentes individuales de antocianinas (tabla 7, a continuación).

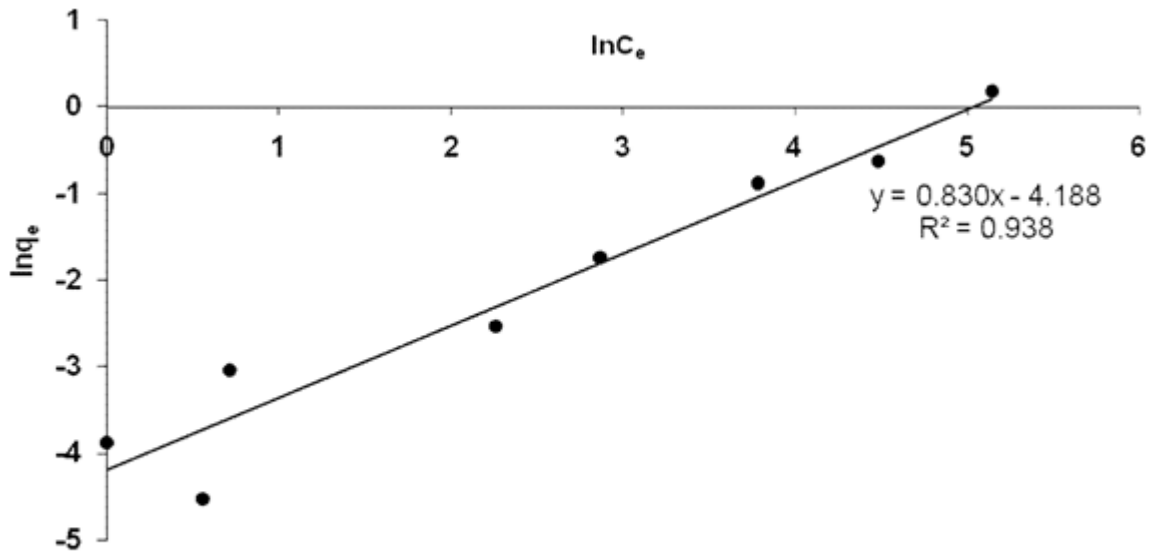
Tabla 7 Resultados de isoterma de adsorción, medidos por HPLC, para dos de las antocianinas individuales, donde los estándares de referencia estaban disponibles

Cy-3-Glu			Cy-3-Rut		
Ex%	C <sub>e</sub>	q <sub>e</sub>	Ex%	C <sub>e</sub>	q <sub>e</sub>
20.1	62.3	0.78	12.2	171.6	1.20
20.0	32.4	0.40	10.8	88.8	0.54
22.9	16.5	0.25	15.8	44.2	0.42
25.4	6.5	0.11	16.7	17.6	0.18
22.7	3.7	0.05	14.2	9.6	0.08
19.7	1.7	0.02	-	-	-
34.5	0.6	0.01	11.0	1.8	0.01
17.5	0.8	0.01	32.0	2.0	0.05
20.5	0.4	0.005	29.2	1.0	0.02



**Figura 4** Isoterma de adsorción de cianidina-3-O-glucósido

La operación de la ecuación de isoterma de Freundlich (ecuación 1) en el conjunto de datos para cianidina-3-O-glucósido nuevamente produjo una excelente relación de línea recta ( $R^2 = 0.979$ ). El intercepto = -4.202, por lo tanto,  $K_F = 0.015 \text{ dm}^3 \text{ g}^{-1}$ , y el gradiente = 0.9686, por lo tanto,  $n_F = 1.03$ , nuevamente en buena concordancia con la obtenida de los cálculos anteriores (antocianina total  $n_F = 1.17$ ).

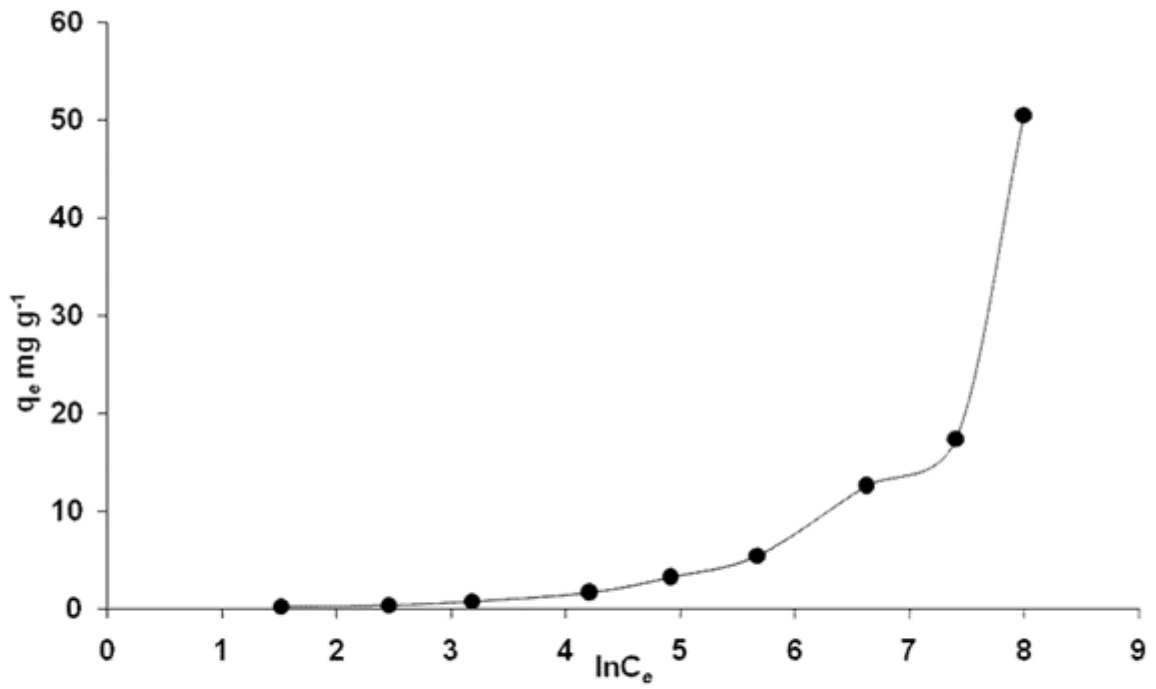


**Figura 5** Isotherma de adsorción de cianidina-3-O-rutinósido

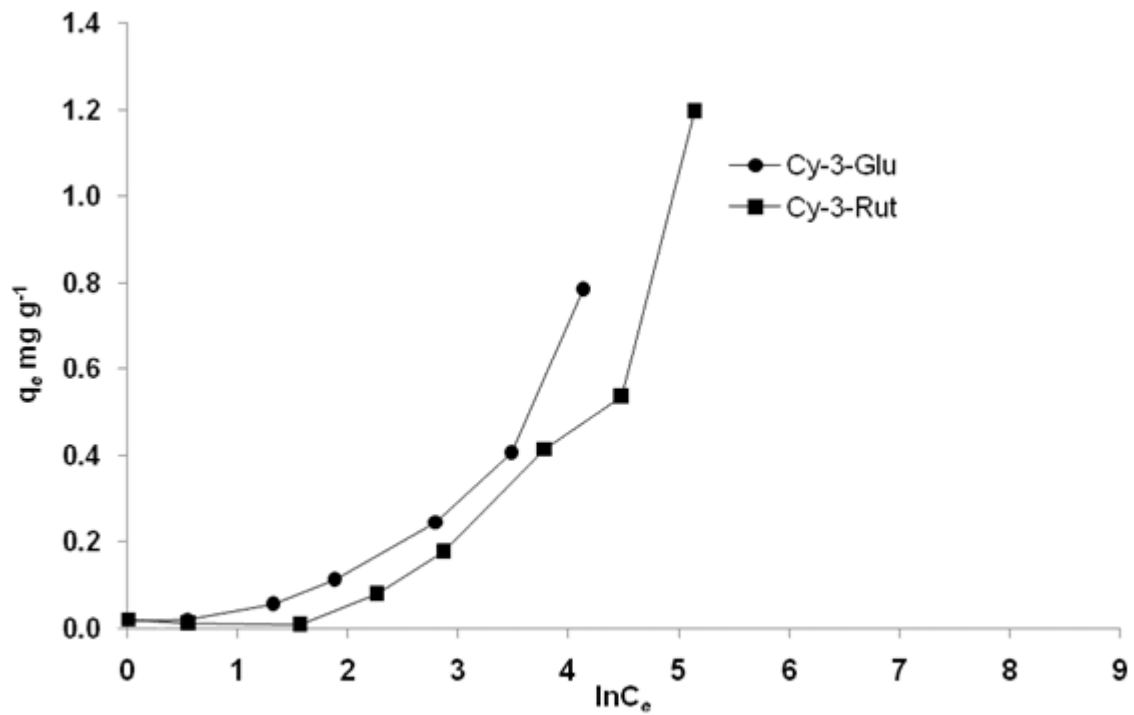
5 Cuando se aplicó la ecuación de Freundlich (ecuación 1) al conjunto de datos para cianidina-3-O-rutinósido, se observó una relación de línea recta ( $R^2 = 0.939$ ). El intercepto = -4.1885, por lo tanto,  $K_F = 0.015 \text{ dm}^3 \text{ g}^{-1}$ , y el gradiente = 0.8307, por lo tanto  $n_F = 1.20$ . Este valor de  $n_F$  está en buena concordancia con el obtenido al considerar el contenido total de antocianinas ( $n_F = 1.17$ ). Estos resultados de la contribución de los componentes de antocianina individuales muestran que la adsorción es favorable para los dos componentes mostrados: cianidina-3-O-glucósido (figura 4) y cianidina-3-O-rutinosida (figura 5).

10 Además de este gráfico de isoterma, los datos también se pueden representar en un número de representaciones con el fin de dilucidar información adicional con respecto a la interacción entre el tinte y la fibra. Uno de estos métodos es graficar el logaritmo de la concentración inicial de baño de tinte  $\ln C_0$ , versus tinte en fibra,  $q_e$ . Dicha gráfica nos permite comprender la acumulación de tinte en la fibra a medida que aumenta la concentración del baño de tinte. Esta gráfica también fue necesaria para proporcionar un conjunto de datos que pudiera compararse directamente con estudios de medición de color posteriores de muestras de cabello teñido con bases de colorante, esto es, no en solución acuosa, donde las concentraciones de baño de tinte pre y post no podrían medirse directamente.

15 La gráfica de la figura 6 muestra un gradiente bajo en las concentraciones más bajas, donde  $0 < \ln C_0 < 4$ . Esto es consistente con una acumulación de monocapa de tinte en fibra, como se esperaba ( $q_e < 2 \text{ mg g}^{-1}$ ). La siguiente parte de la gráfica ( $4 < \ln C_0 < 7$ ;  $2 < q_e < 15 \text{ mg g}^{-1}$ ) muestra un aumento en el gradiente. Se sugiere que esto representa un nivel de apilamiento lateral de las moléculas de tinte (hemimicelar). Más allá de esta región, el gradiente de la curva aumenta dramáticamente ( $7 < \ln C_0 < 8$ ;  $15 < q_e < 50 \text{ mg g}^{-1}$ ). Esto representa el apilamiento multinivel de las moléculas de tinte (admicelar), efectivamente donde ocurre la acumulación de color.



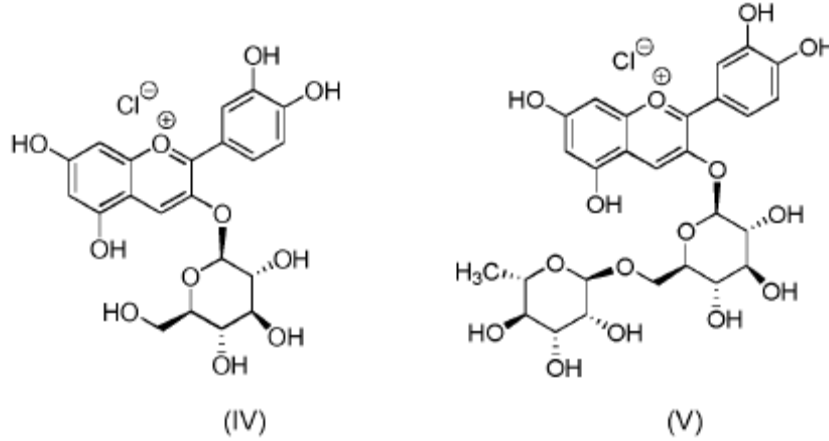
**Figura 6** Gráfico de antocianinas del logaritmo de la concentración de equilibrio  $\ln C_e$ , versus tinte en fibra,  $q_e$



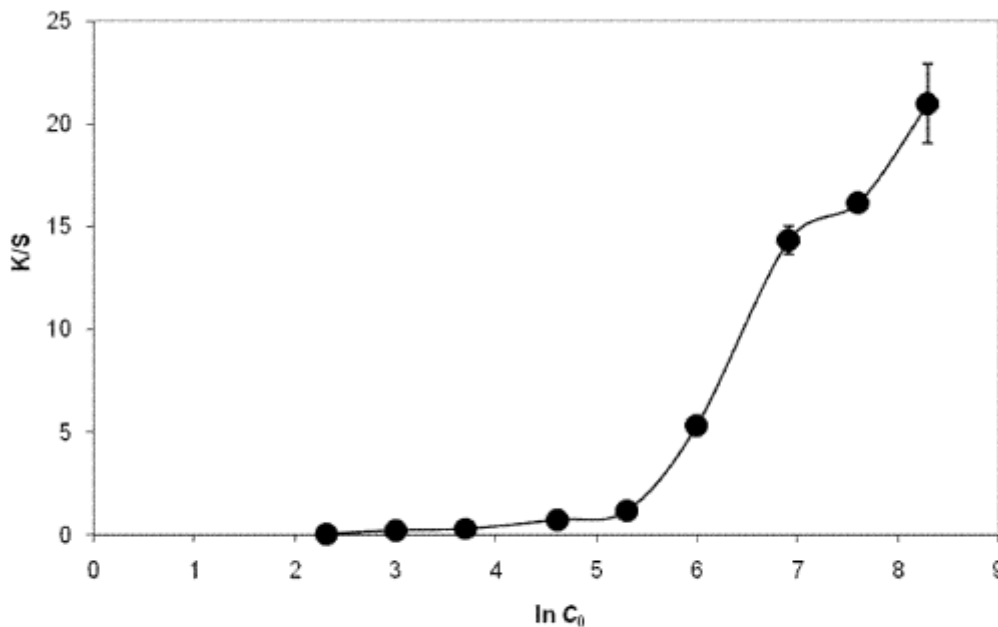
**Figura 7** Gráfico de antocianinas individuales del logaritmo de la concentración de equilibrio  $\ln C_e$  versus tinte en fibra,  $q_e$

Cuando se analizaron los datos para dos de las antocianinas individuales, se observó una similitud obvia en la forma de los gráficos (como se muestra en la figura 7). Sin embargo, también se hizo evidente una diferencia clave, los

valores de tinte en fibra ( $q_e$ ) fueron más altos en el caso de cianidina-3-O-glucósido que para cianidina-3-O-rutinósido. La diferencia estructural entre estos dos compuestos radica en la sustitución del azúcar; cianidina-3-O-glucósido (IV;  $M_w = 484.84$ ) tiene una unidad de monosacáridos, mientras que la cianidina-3-O-rutinosida (V;  $M_w = 630.98$ ) tiene una unidad de disacáridos.



- 5 En términos de la química de adsorción del tinte, esto es significativo cuando se favorecen los compuestos de menor tamaño molecular debido al impedimento estérico alrededor de los sitios de sorción. Tanto las antocianinas glucósidos como los rutinósidos tienen múltiples sitios funcionales hidroxilo para facilitar el enlace de hidrógeno con la fibra.
- 10 En conclusión, estos resultados son consistentes con la isoterma de Freundlich, con enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals que dominan la interacción entre la fibra del cabello y las moléculas del tinte.
- Además, estas proporciones se apoyaron en estudios de medición de color diseñados para registrar y cuantificar el cambio en el color de las fibras del cabello en relación con una muestra de referencia sin teñir.



**Figura 8** K/S (intensidad del color) vs  $\ln C_0$  (donde  $C_0$  es la concentración inicial del baño de tinte)

- 15 La figura 8, arriba, resalta la relación entre la concentración inicial del baño de tinte ( $C_0$ ), mostrada logarítmicamente, y la intensidad de color observada en el cabello, medida en términos de reflectancia (K/S) a  $\lambda_{max}$ . Los valores de K/S

se miden en relación con una muestra de referencia de fibras de cabello sin teñir. Como se puede observar, la intensidad del color observada fue muy baja ( $K/S < 1$ ) en los puntos de datos más bajos ( $2 < \ln C_0 < 5$ ;  $K/S < 1$ ), y esto se debió a la adsorción en monocapa. En los puntos de datos más altos ( $\ln C_0 > 5$ ), se observó un gradiente pronunciado donde la intensidad del color aumentó notablemente ( $1 < K/S < 22$ ) debido a la agregación de múltiples capas.

5

Estudio de tinte preferencial

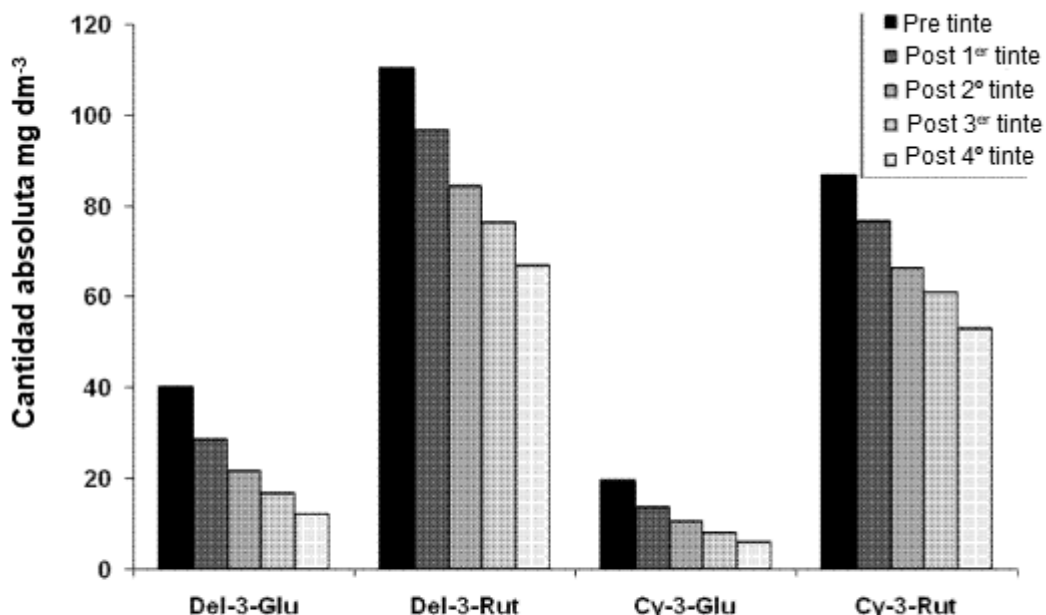
Para comprender mejor el comportamiento de sorción de la mezcla de antocianinas, fue necesario investigar la adsorción preferencial de los componentes individuales de antocianinas. Por lo tanto, se realizó una serie de teñidos sucesivos usando el mismo baño de tinte.

10 Se aplicó una muestra de cabello (0.40 g, rubio claro, preenjaponado con champú) a un baño de tinte regulado de extracto de antocianina de grosella negra ( $1000 \text{ mg dm}^{-3}$ , 20.0 ml, ácido cítrico/citrato de sodio 0.2 M, pH 3.0). Estudios anteriores nos permitieron asumir con confianza que el equilibrio de la adsorción se alcanzaría después de una hora. En este punto, el cabello se retiró del baño de tinte y se añadió una segunda muestra de cabello de igual peso y tratamiento previo. Esto se realizó usando un total de cuatro muestras de cabello. Aunque se calculó que el baño de tinte original tenía una proporción de baño de tinte: fibra de 50:1, no se añadió líquido adicional para compensar las pérdidas mínimas cuando se eliminaron las fibras de cabello. El método de HPLC validado se usó para detectar la concentración de antocianina del baño de tinte original y después de cada teñido sucesivo (1 hora, RT).

15

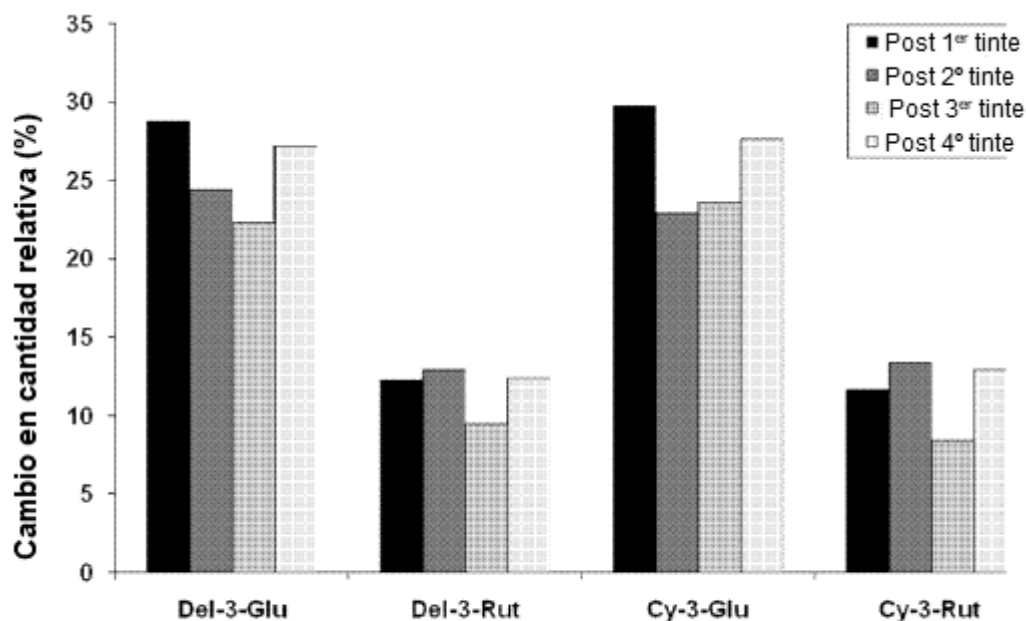
20 Los datos se analizaron para confirmar que la absorción de cada una de las antocianinas del componente era realmente favorable, y los resultados se exponen en la figura 9. Se encontró que la proporción de distribución del baño de tinte inicial para delfinidina-3-O-glucósido: delfinidina -3 O-rutinósido: cianidina-3-O-glucósido: cianidina-3-O-rutinósido era consistente con estudios previos (15.6: 43.0: 7.6: 33.8). Después de las cuatro tinturas sucesivas, se encontró que la proporción de componentes en el baño de teñido posterior fue significativamente diferente (8.9: 48.5: 4.2: 38.4), lo que sugiere que las antocianinas monosacárido (glucósido) (Del-3- O-Glu y Cy-3-O-Glu) se adsorbieron preferentemente a las fibras sobre las antocianinas disacárido (rutinósido) (Del-3-O-Rut y Cy-3-O-Rut).

25



**Figura 9** Cantidades absolutas de antocianinas individuales en baño de tinte después de teñidos sucesivos, detectadas por HPLC





**Figura 10** Cambios en cantidades relativas (%) de antocianinas individuales en baño de tinte después de teñidos sucesivos, detectadas por HPLC

El cambio en las cantidades relativas (%) de componentes se analizó adicionalmente para mostrar un comportamiento extremadamente consistente en cada uno de los teñidos, como se muestra en la figura 10. El cambio promedio en las cantidades relativas de antocianinas en el sistema también se encontró que es extremadamente consistente con respecto a su funcionalidad de azúcar. Ambas antocianinas con unidades estructurales de monosacáridos mostraron un rendimiento muy similar (tabla 8, entradas 1 y 3, 25.7% y 25.9%). Las estadísticas también fueron consistentes en el comportamiento del par de antocianinas que contienen unidades de disacáridos (tabla 8, entradas 2 y 4, 11.8% y 11.6%).

Tabla 8 Cambio relativo y promedio en las concentraciones (%) de antocianinas componentes en cuatro teñidos sucesivos

Entrada	Antocianina	Conc. relativa inicial %	Conc. relativa final %	Cambio promedio en conc. %
1	Del-3-Glu	15.6	8.9	25.7
2	Del-3-Rut	43.0	48.5	11.8
3	Cy-3-Glu	7.6	4.2	25.9
4	Cy-3-Rut	33.8	38.4	11.6

En resumen, las cuatro antocianinas componentes se adsorbieron, mostrando un comportamiento consistente en todo el estudio, con respecto a sus características estructurales y funcionales. Se encontró que los componentes con grupos de azúcar más pequeños se adsorbían preferentemente sobre aquellos con grupos de azúcar más grandes. La sorción favorable es consistente con estudios previos de isotermas, donde se encontró que la unión de hidrógeno es la interacción dominante entre las antocianinas y el cabello. Aunque las unidades de azúcar de disacárido contienen más sitios de enlace de hidrógeno que las contrapartes de monosacáridos, también resultan en un tamaño molecular más grande (diferencia en  $M_w$  entre IV y V = 146.1), lo que se espera que impida la sorción.

Aplicación de formulación de base de tinte

Las series de tintes se realizaron usando dos formulaciones de base de colorante estándar, en este documento denominadas Base 1 (pH 5.0-5.5) y Base 2 (pH 9.0-9.5). Se diseñó un procedimiento para incorporar el polvo de

antocianina en cada formulación de base, con el fin de administrar el tinte en el cabello de una manera representativa de un producto comercial.

La intención era realizar una serie completa de teñidos para permitir un nivel de comparación con los sistemas acuosos anteriores, y evaluar la estabilidad general y el comportamiento del tinte dentro de la formulación. Como se discutió anteriormente, la técnica analítica primaria fue la medición del color de reflectancia, realizada en las muestras de cabello teñido.

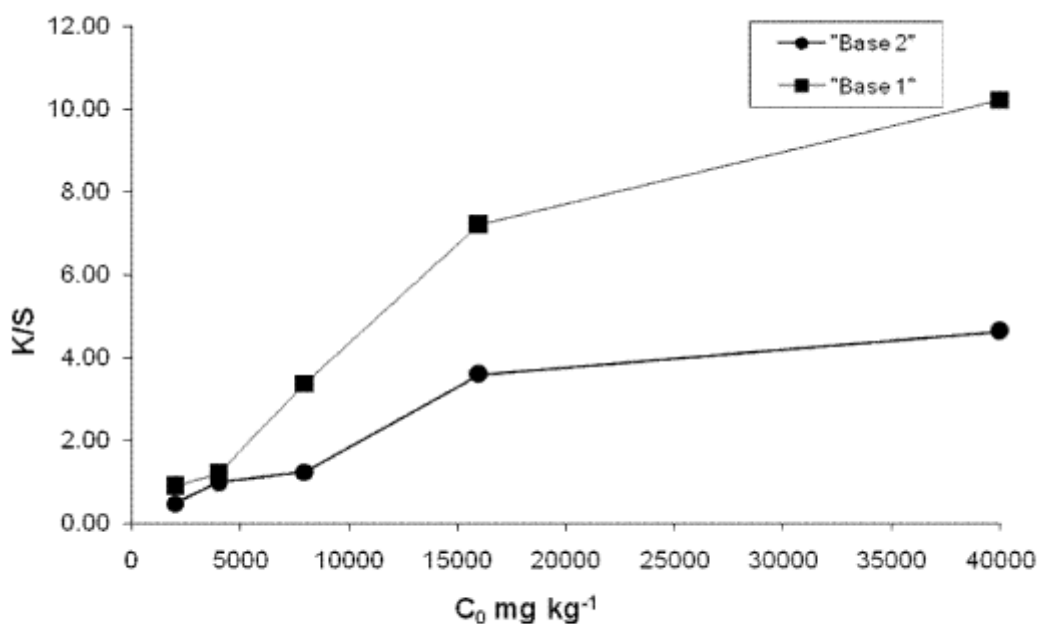
5

El polvo de tinte (5-100 mg) se disolvió inicialmente en el solvente mínimo (~0.5 ml; solución reguladora de ácido cítrico/citrato de sodio 0.2 M, pH 3.0) y posteriormente se incorporó en la base de tinte (2.50 g), con una mezcla minuciosa. La pasta de tinte se aplicó luego a muestras de cabello decoloradas humedecidas previamente enjabonadas con champú (~1 g cada una), a mano con un suave masaje y peinado y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después de reposar, la muestra se enjuagó con agua tibia corriente durante 2-3 minutos con un peinado para asegurar la eliminación completa de la pasta de tinte, posteriormente se acondicionó y enjuagó antes de secar con un secador de pelo. Una vez completamente seco, se tomó una medición del color de reflectancia de cada muestra.

10

15 Tabla 9 Medición de color (K/S) versus concentración de tinte. \* Valores  $C_0$  ( $\text{mg kg}^{-1}$  de pasta), sugeridos como valores equivalentes a los baños de tinte en fase líquida ( $\text{mg dm}^{-3}$ )

Entrada	Tinte mg en 2.5 g de pasta	% en peso de tinte	* $C_0$ $\text{mg kg}^{-1}$	Base 1		Base 2	
				K/S	$\lambda_{\text{max}}$	K/S	$\lambda_{\text{max}}$
1	5	0.2	2000	0.89	580	0.48	580
2	10	0.4	4000	1.19	580	0.98	580
3	20	0.8	8000	3.37	580	1.24	580
4	40	1.6	16000	7.20	580	3.59	570
5	100	4.0	40000	10.22	570	4.63	570



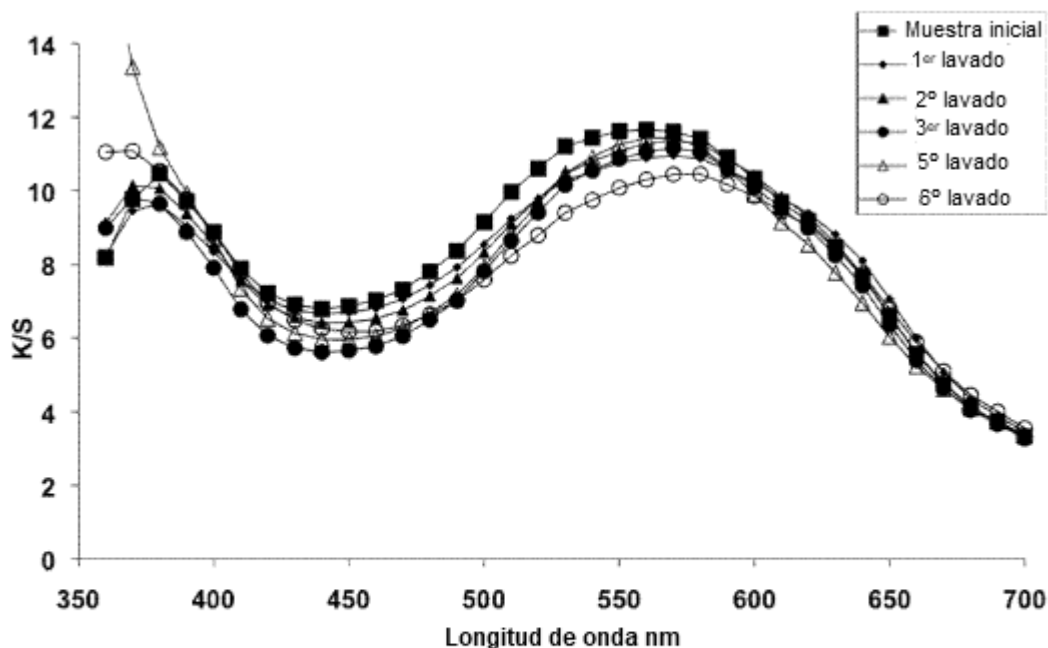
**Figura 11** Gráfico de medición de color de  $K/S$  versus el logaritmo de concentración de tinte de base colorante ( $\ln C_0$ ) de Base 1 y Base 2 (véase la Tabla 9)

La figura 11 resalta la diferencia obvia entre la eficacia de los teñidos realizados en las dos bases de tinte. A bajas concentraciones ( $0.2 < C_0 < 0.4\%$ ), los valores de K/S observados son similares. Sin embargo, la base de pH más bajo (Base 1) claramente da K/S superior a medida que aumenta la concentración, en la medida en que K/S es más del doble del valor de Base 2 en el punto de datos más alto (4.0% en peso, K/S = 10.22 vs 4.63).

## 5 Solidez del lavado

Las investigaciones sobre las propiedades de solidez de los tintes para el lavado se realizaron siguiendo un procedimiento estandarizado, usando champú y acondicionador. Cada ciclo de lavado comprende la aplicación de champú, el enjuague a fondo con agua tibia y el peinado, la aplicación repetida del champú, el enjuague a fondo, seguido de una sola aplicación de acondicionador, el enjuague final, seguido del secado con un secador de pelo doméstico con peinado. Se llevó a cabo un total de 6 ciclos de lavado (12 champús) para cada muestra. Las mediciones de reflectancia (K/S) se registraron para muestras de cabello seco después de cada ciclo de lavado, donde se tomó el promedio de 4 mediciones a través del espectro de longitud de onda visible (360-700 nm).

Una muestra de cabello se teñó con antocianinas de grosella negra en un baño de tinte acuoso, siguiendo nuestros procedimientos estándar. Se registró la intensidad de color inicial y el máximo de absorbancia (figura 11; K/S 11.7,  $\lambda_{\max} = 560$  nm). Después del primer ciclo de lavado, como se describió anteriormente, se observó una pérdida de color mínima (K/S = 11.0, pérdida del 6%), aunque mostró un cambio en  $\lambda_{\max}$  a una longitud de onda mayor (570 nm; nota incrementos de 10 nm registrados). Después de seis ciclos de lavado, se encontró que la resistencia al lavado era excelente (K/S = 10.5, 10% de pérdida), y el cambio de color se había estabilizado ( $\lambda_{\max} = 570$  nm).

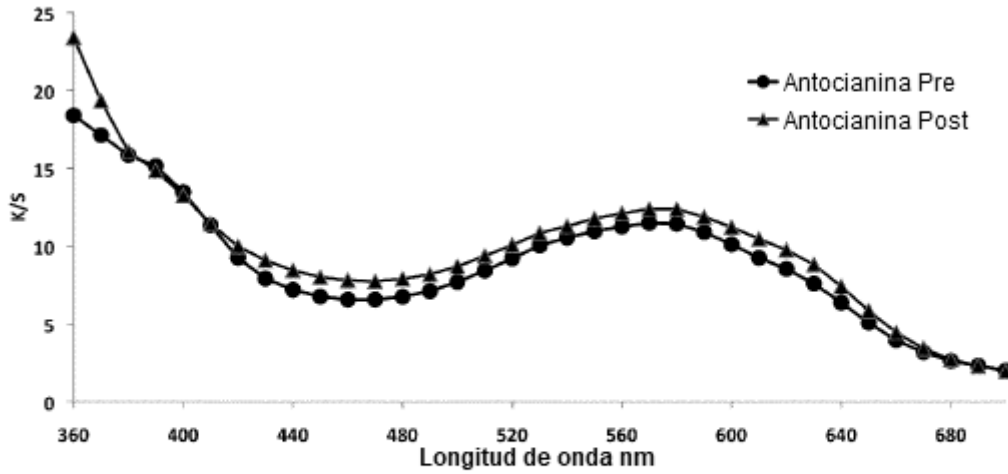


**Figura 12** Gráfico de medición de color de K/S versus la longitud de onda del estudio de solidez de lavado en muestra teñida con antocianinas de grosella negra en un baño de tinte acuoso

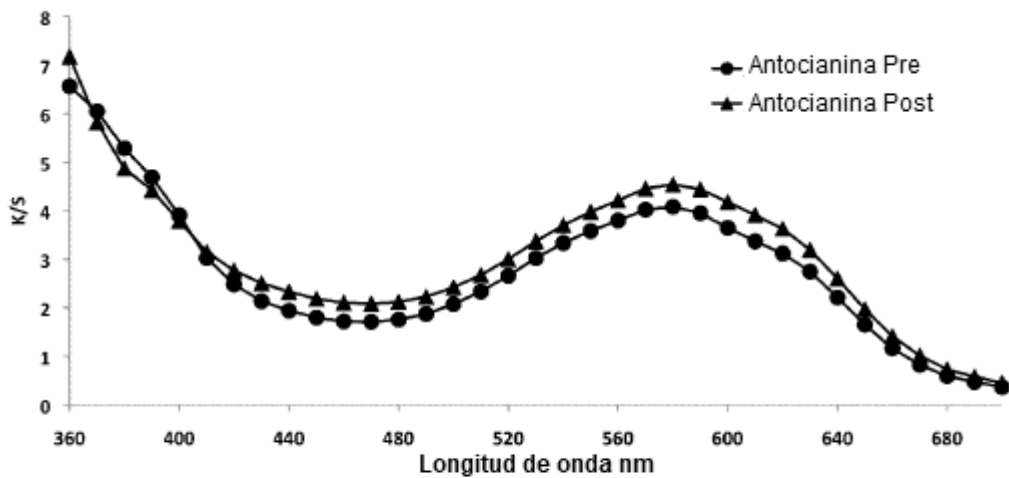
## 20 Resistencia a la luz

Un problema conocido con los tintes naturales tradicionales en las fibras textiles es su escasa solidez en las condiciones ambientales en comparación con los tintes sintéticos modernos, lo que da como resultado la decoloración con la exposición continua, por ejemplo, a la luz solar directa. Los estudios se realizaron usando una lámpara de simulación de luz diurna a humedad controlada (Atlas Xenotest Alpha LM; 60% de humedad). Se analizaron muestras de cabello teñidas con antocianinas (en baños de tinte acuosos y bases de formulación típicas) contra el Blue Wool Standard, comúnmente utilizado para investigaciones sobre tintes textiles. Todas las muestras se montaron dentro del aparato y se expusieron continuamente a la lámpara durante 6 horas. Las muestras se analizaron por duplicado con muestras originales adicionales como referencia. Esto fue equivalente a 3.5 en la escala de Blue Wool Standard. Los resultados del estudio se muestran mejor comparando la medición de la reflectancia del color (K/S) de las muestras antes y después de la exposición (véanse las figuras 13 y 14, tabla 10).

El desvanecimiento del color resultaría en una reducción en el valor K/S (intensidad del color de reflectancia), y un cambio potencial en la máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ).



**Figura 13** Medición de color de muestra de cabello teñida con antocianinas de grosella negra en un baño de tinte acuoso; muestras tomadas antes y después de la exposición a simulación de luz diurna



**Figura 14** Medición de color de muestra de cabello teñida con antocianinas de grosella negra en Base 1; muestras tomadas antes y después de la exposición a simulación de luz diurna

Tabla 10 Resultados de medición de color (K/S) y absorción máxima ( $\lambda_{max}$ ) para muestras antes y después de la exposición a la simulación de luz diurna

Muestra	Antocianinas	
	$\lambda_{max}$ (nm)	K/S
Acuosa Pre	570 - 580	11.5

Acuosa Post	570 - 580	12.4
Base 1 Pre	580	4.3
Base 1 Post	580	4.8

5 En los sistemas de baño de tinte acuoso, los resultados obtenidos para las antocianinas mostraron que no se había producido un desvanecimiento del color perceptible. De hecho, los valores de K/S habían aumentado ligeramente, lo que se confirmó mediante la inspección de resultados duplicados, sin embargo, se considera que están dentro del error experimental de la técnica.

Estas observaciones se repitieron cuando se inspeccionaron las muestras teñidas con antocianinas en bases de formulación, incluido el ligero aumento del valor K/S. En un breve resumen, las muestras de cabello teñidas con antocianinas, ya sea en baños de tinte o por medio de bases de formulación, mostraron una excelente resistencia a la exposición a la luz.

#### 10 Condiciones generales de aplicación

Los aspectos de la divulgación incluyen formulaciones para el tratamiento de cabello humano que comprenden al menos una mezcla de tinte mencionada anteriormente, el uso de dichas mezclas de tinte y formulaciones para el teñido de fibras queratínicas que preferiblemente comprenden cabello humano, y métodos para la coloración semipermanente del cabello humano que comprenden tratar el cabello humano con dichas mezclas y formulaciones de tinte.

15 La invención comprende un método para la aplicación de antocianinas al cabello humano, compatible con aplicaciones cosméticas comunes para la coloración. Las antocianinas se incorporan en una formulación base, tal como un acondicionador, champú u otro producto similar. Las antocianinas primero se toman en solución líquida en cualquiera de agua, etanol, glicerol u otro solvente similar. Dicho solvente se puede modificar con aditivos, para controlar el pH (entre 2 y 7), tal como ácidos (por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, acético, trifluoroacético, ascórbico, cítrico, fórmico, láctico, tartárico, alcanfor-10-sulfónico u oxálico) o sistemas de solución reguladora ácida (por ejemplo, ácido cítrico/citrato de sodio u otros sistemas comunes) para mantener un pH entre 2 y 7, a una temperatura entre 20 y 45 °C. La solución de antocianina se incorpora luego a la formulación de la base de administración apropiada mezclando, a una temperatura entre 20 y 45 °C, y a una concentración entre 0.1 y 50 g de antocianinas por kg de base de formulación.

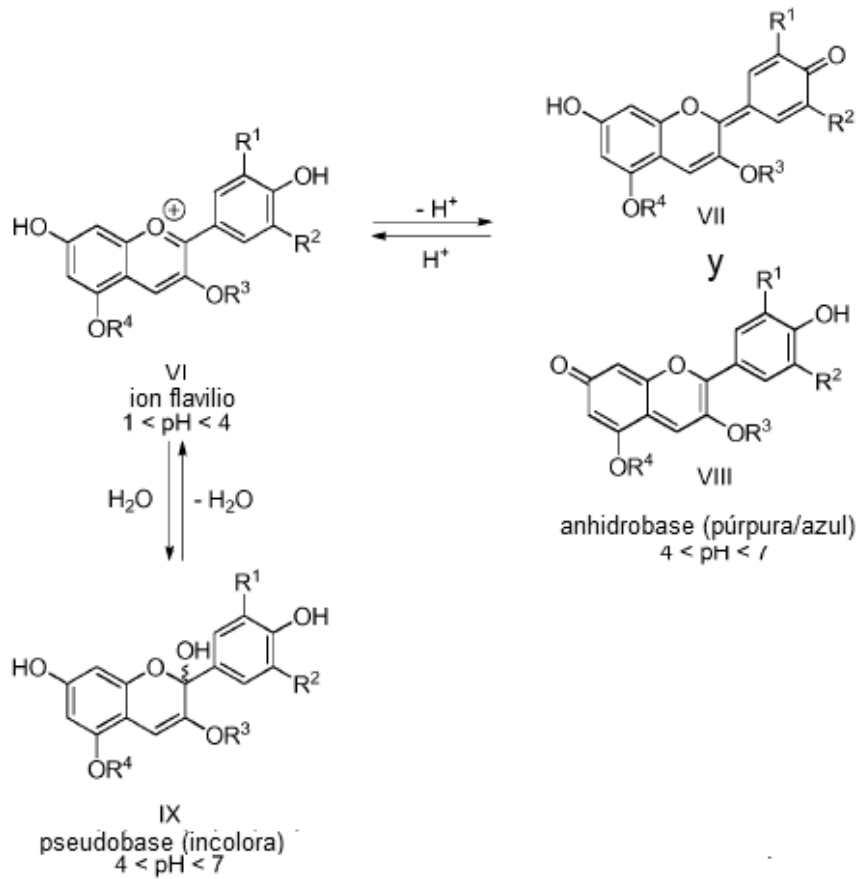
La formulación de tinte se puede aplicar luego al cabello humano a una temperatura entre 15 y 40 °C (preferiblemente a temperatura ambiente), a mano con un suave masaje y peinado según la práctica común para una distribución y aplicación uniformes de las pastas colorantes. La pasta se deja sobre el cabello durante un período de 5 a 45 minutos, mientras que la captación de tinte sobre el cabello se lleva a cabo. El procedimiento de teñido se detiene luego de un enjuague minucioso del cabello con agua, para eliminar la pasta. Luego, el cabello puede ser acondicionado o lavado con champú y luego acondicionado, como se haría en un ambiente doméstico, para eliminar cualquier pasta residual y/o colorante. Luego, el cabello se puede secar con una toalla o secar con un secador de cabello doméstico convencional, según el uso doméstico habitual.

Los sistemas y concentraciones de ejemplo se resumen en la tabla 3 con su intensidad de color de reflectancia resultante, descrita en K/S en la máxima absorción, cuando se aplica a muestras de cabello humano rubio claro.

El procedimiento anterior se puede usar como se describe para los colorantes de antocianinas, o también en combinación con otros compuestos naturales. Cuando se usan antocianinas en este sistema como colorante único o primario, es posible lograr dos efectos de uso en la industria cosmética de la coloración del cabello. El primero es una coloración azul del cabello humano, caracterizada por una máxima absorción en el espectro de reflectancia de entre 570 y 600 nm. Para este efecto, se recomienda una concentración entre 0.2 y 10% en peso de las formulaciones. Por lo tanto, esta coloración azul puede actuar como un componente de color en una paleta mixta para cubrir los marrones. En dicho producto, se recomiendan concentraciones entre 0.2 y 10% en peso de las formulaciones.

La segunda aplicación identificada está en concentraciones más bajas para lograr un efecto de "plateado". Para este efecto, las concentraciones entre 0.01 y 0.4% en peso son las más preferibles.

Se sabe que las antocianinas en solución acuosa ácida (1 <pH <4) producen un color rojo/naranja (500 nm < $\lambda_{\max}$  <530 nm; tabla 11), el cromóforo que surge de la forma estable del ion flavilio (VI). Cuando aumenta el pH de dicha solución ácida (4 <pH <6), predomina la anhidrobases púrpura/azul (VII y VIII) (570 nm < $\lambda_{\max}$  <620 nm). Sin embargo, en solución acuosa, esta forma es fácilmente susceptible de hidratación, lo que resulta en la forma de pseudobase incolora (IX).



**Figura 15** Efecto de cambio de pH en las estructuras de antocianinas

Tabla 11 Estructuras y máxima absorción para las antocianinas comunes (véase también la figura 15); \*valores de  $\lambda_{\text{max}}$  mostrados son correspondientes para las antocianinas 3-O-glucósido a pH 3.0

Nombre	R1	R2	R3	R4	* $\lambda_{\text{max}}$
Pelargonidina	H	H	Glu	H	503
Cianidina	OH	H	Glu	H	517
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	Glu	H	517
Delfinidina	OH	OH	Glu	H	526
Petunidina	OH	OCH <sub>3</sub>	O-Glu	H	526
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	O-Glu	H	529

De manera importante, cuando se usan para teñir en formulación o solución acuosa a pH <4, las antocianinas se absorben en las fibras de queratina (cabello humano) produciendo un color azul consistente con la forma de anhidrobase neutra en lugar del catión de flavilio. Dicho efecto es inesperado y particularmente relevante debido a la falta de disponibilidad de tintes azules naturales. Es probable que este efecto se deba a la neutralización in situ del

catión flavilio catiónico por los sitios básicos en la superficie del cabello, lo que lleva a la formación de la anhidrobase, lo que es particularmente notable.

5 De manera significativa, se comprobó que dicho cabello teñido también era estable para los ciclos de lavado (champú y acondicionador) y para la simulación de la luz diurna. También se observa que la  $\lambda_{\max}$  real observada en el cabello depende de las antocianinas particulares empleadas.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprenden" y "contienen" y sus variaciones significan "incluyendo pero no limitado a", y no pretenden (y no) excluir otras unidades estructurales, aditivos, componentes, números enteros o etapas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, se debe entender que la memoria descriptiva contempla la pluralidad y la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

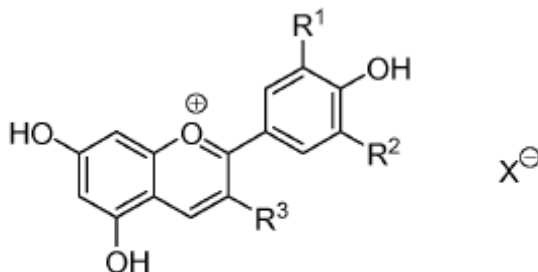
15 Los rasgos, números enteros, características, compuestos, unidades estructurales químicas o grupos descritos junto con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención deben entenderse como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en este documento a menos que sea incompatible con los mismos. Todas las características descritas en esta memoria descriptiva (incluidas las reivindicaciones, el resumen y los dibujos adjuntos), y/o todas las etapas de cualquier método o procedimiento descrito así, se pueden combinar en cualquier combinación, excepto en combinaciones donde al menos algunas de estas características y/o las etapas son mutuamente excluyentes. La invención no está restringida a los detalles de ninguna de las realizaciones anteriores. La invención se extiende a cualquier novedoso, o cualquier nueva combinación, de las características descritas en esta memoria descriptiva (incluidas las reivindicaciones adjuntas, el resumen y los dibujos), o a cualquier novedoso, o cualquier nueva combinación, de las etapas de cualquier método o procedimiento descrito así.

20 La atención del lector se dirige a todos los artículos y documentos que se archivan de forma concurrente o previa a esta memoria descriptiva en relación con esta solicitud y que están abiertos a inspección pública con esta memoria descriptiva.

25

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la coloración semipermanente del cabello humano, comprendiendo dicho método tratar el cabello humano con una mezcla de tinte comprendida en una formulación, en el que dicha mezcla comprende una multiplicidad de materiales polifenólicos, en el que dichos materiales se obtienen de una fuente botánica; en el que dichos materiales polifenólicos comprenden compuestos de antocianina y dichos compuestos de antocianina son antocianidinas de aglicona o antocianinas glicosiladas de fórmula (III):



(III)

- en el que  $R_1$  y  $R_2$  son, independientemente, H, OH u  $OCH_3$ ,  $R_3$  es OH (antocianidinas de aglicona) o un grupo O-glicosilo (antocianinas glicosiladas), y X es un contraión que se puede seleccionar opcionalmente de cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bisulfato, carbonato, bicarbonato, citrato, formiato, acetato o tartrato, en el que dicha formulación es un champú y/o un acondicionador; en el que dicha formulación comprende concentraciones de dichas antocianinas de entre 0.01 y 0.40% en peso de la formulación; y en el que dicha formulación proporciona un efecto de "plateado".
2. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho método comprende tratar el cabello con dicha formulación a pH <4.
3. Un método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que al menos una antocianina en la mezcla de colorante se selecciona de pelargonidina (III;  $R_1 = R_2 = H$ ,  $R_3 = OH$ ), cianidina (III;  $R_1 = R_3 = OH$ ,  $R_2 = H$ ), peonidina (III;  $R_1 = OCH_3$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = OH$ ), delphinidina (III;  $R_1 = R_2 = R_3 = OH$ ), petunidina ( $R_1 = R_3 = OH$ ,  $R_2 = OCH_3$ ) y malvidina ( $R_1 = R_2 = OCH_3$ ,  $R_3 = OH$ ).
4. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho grupo glicosilado comprende un monosacárido o polisacárido.
5. Un método según la reivindicación 4, en el que dicho polisacárido comprende un disacárido o trisacárido.
6. Un método según la reivindicación 4, en el que dicho monosacárido se selecciona de O-glucósido, O-ramósido, O-arabinósido, O-xilósido y O-galactósido.
7. Un método según la reivindicación 5, en el que dicho disacárido se selecciona de O-rutinósido, O-soforósido y O-primeverósido.
8. Un método según la reivindicación en cualquier reivindicación precedente, en el que dicha formulación se aplica al cabello humano a una temperatura entre 15 y 40 °C.
9. Un método según la reivindicación en cualquier reivindicación precedente, en el que dicha formulación se deja en el cabello durante un período de 5 a 45 minutos y dicho cabello se enjuaga posteriormente con agua.
10. Un método según la reivindicación en cualquier reivindicación precedente, en el que dicha fuente botánica es fruta.
11. Un método según la reivindicación 10, en el que dicha fruta se selecciona de grosellas negras, moreras, moras azules, arándanos, arándanos rojos, uvas, aronia, bayas de Saskatoon, espinos amarillo, moras, acai, cerezas y/o higos