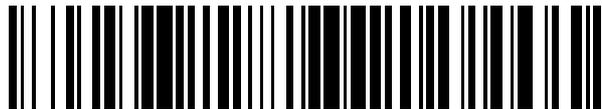


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 992**

51 Int. Cl.:

A61K 8/362 (2006.01)

A61K 8/37 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A61K 8/97 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2010 PCT/FR2010/051323**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2010 WO10149942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10745340 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2445476**

54 Título: **Composición destinada a la protección solar**

30 Prioridad:

25.06.2009 FR 0954354

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

21.03.2019

73 Titular/es:

**BIOPHYTIS (50.0%)
14 avenue de l'Opéra
75001 Paris, FR y
SORBONNE UNIVERSITE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VEILLET, STANISLAS;
LAFONT RENÉ y
DIOH, WALY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 704 992 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición destinada a la protección solar

Campo técnico

5 La invención se refiere a una composición destinada a un uso para la protección de la piel contra los efectos nefastos de la radiación solar ultravioleta.

Estado de la técnica

10 Se sabe que la radiación solar puede ser nociva para el ser humano. En efecto, gran parte de la energía solar es emitida en forma de radiación UV que penetra profundamente en la epidermis. La piel, para defenderse de esta radiación, sintetiza melanina que es un pigmento apto para absorber la radiación UV y limitar su penetración profunda en la dermis. Sin embargo, la tasa de melanina sintetizada varía de un individuo a otro y la filtración no es suficiente para proteger de forma segura contra las agresiones solares. Principalmente, la radiación UVB de longitud de onda comprendida entre 280 y 320 nm provoca eritemas y quemaduras en las pieles sensibles o expuestas frecuentemente al sol. Igualmente, la radiación UVA de longitud de onda comprendida entre 320 y 400 nm, aunque permite el bronceado, es igualmente conocida por acelerar el envejecimiento de la piel y está implicada en el desarrollo de numerosos cánceres cutáneos.

15 Se han realizado numerosos estudios para poner a punto composiciones, lo más a menudo tópicas, destinadas a proteger la piel de las agresiones solares cuando ésta está expuesta.

20 Estas composiciones comprenden frecuentemente carotenoides conocidos por ser utilizados por las plantas para protegerse de las agresiones del sol. Los carotenoides son pigmentos más bien de color naranja y amarillo extendidos en numerosos organismos vivos. Pertenecen a la familia química de los isoprenoides y son liposolubles. Son sintetizados por las algas, las plantas verdes y numerosos hongos y bacterias (entre ellas, las cianobacterias). Los animales no son capaces de producirlos, pero los encuentran en su alimentación.

25 Los carotenoides son conocidos por su actividad fotoprotectora, relacionada por una parte con su absorción de la radiación luminosa (función de pantalla) y, por otra parte, por sus propiedades antioxidantes que les permite neutralizar eficazmente los radicales peróxido y las moléculas de oxígeno singlete (Sies y Stahl, 1995, 2004). Se pueden utilizar por vía externa, pero también por vía interna, en la medida en que una parte de los carotenoides ingeridos por los animales se encuentra en su tegumento. Estudios de suplementación con β -caroteno y licopeno, solos o mezclados con otros carotenoides, muestran una fotoprotección sistémica medida por una disminución de los eritemas inducidos por la radiación UV.

30 Un estudio clínico ha demostrado que una mezcla de carotenoides reduce el estrés oxidativo. Este estudio clínico aleatorizado en doble ciego contra placebo describe el efecto de los carotenoides sobre 32 individuos no fumadores y con buena salud que han recibido diariamente y de forma cruzada durante periodos de 3 semanas, separadas por una pausa de 12 semanas, 4 cápsulas que contienen cada una bien 1 g de aceite de pescado o bien 1 g de aceite de pescado suplementado con una mezcla de carotenoides (7,6 mg de carotenoides totales, de los cuales 2,9 mg de bixina por cápsula). Se ha observado que esta mezcla de carotenoides reduce el estrés oxidativo inducido por el consumo de aceite de pescado (muy rico en ácidos grasos poliinsaturados 20:5 y 20:6). Esto se ilustra por una estabilidad aumentada de las LDL en un ensayo de oxidación *ex vivo* y la reducción de la concentración de un marcador de degradación del ADN (la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) a nivel de la orina (Kiokias y Gordon, 2003).

35 Otro estudio en ratas ha mostrado que la administración ora de varios carotenoides, entre ellos la bixina (200 micromoles = 80 mg por kg de masa corporal) antes de una irradiación γ (1,5-3,0 Gy) reduce la aparición de lesiones cromosómicas, apreciado por el análisis de los micronúcleos (Thresiamma *et al.*, 1998). La bixina, administrada oralmente Previamente a una quimioterapia es capaz de reducir sus efectos secundarios (Silva *et al.*, 2001).

40 La actividad antioxidante de la norbixina también ha sido estudiada en el ADN plasmídico induciendo rupturas radicálicas con peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , en presencia de iones Sn^{2+} o Fe^{2+} - reacción de Fenton: pequeñas concentraciones de norbixina (10 μ M) protegen el ADN puesto en presencia de H_2O_2 10 μ M (Kovary *et al.*, 2001).

45 Por otra parte, la norbixina aumenta en un factor de 10 la supervivencia de las bacterias (*E. coli*) sometidas a la radiación UV, a peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , o aniones superperóxido O_2^- . La inducción del sistema SOS por la radiación UVC se reduce 2,3 veces en presencia de la norbixina (Júnior *et al.*, 2005).

50 Por último, la norbixina tiene una actividad antimutágena y reduce así en 87% el efecto mutágeno del H_2O_2 sobre la *Salmonella typhimurium* (Kovary *et al.*, 2001).

Más globalmente, se ha demostrado en sistemas acelulares que los carotenoides pueden neutralizar los aniones superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa. Esta capacidad de neutralización depende de la naturaleza del carotenoide y disminuye en el orden cantaxantina > bixina > luteína > β -caroteno (Corol *et al.*, 2003). Por sus efectos antioxidantes, se ha propuesto así añadir bixina en alimentos (Levy y Levy, 2003).

Sobre esta base, se han desarrollado composiciones que contienen carotenoides liposolubles, destinadas a ser aplicadas sobre la piel antes y en el momento de la exposición al sol, con el fin de protegerla de los daños del sol. Sus propiedades pigmentarias permiten colorear simultáneamente las células de la epidermis de anaranjado, acentuando la impresión de bronceado. Principalmente, se ha desarrollado una composición cosmética filtrante fotoestable para la protección de la epidermis humana contra la radiación UV, que comprende una cantidad pequeña (0,0025-0,009% en peso) de bixina en un extracto oleoso (Grollier *et al.*, 1991).

Pero los carotenoides también pueden ser ingeridos para desempeñar su función antioxidante a nivel principalmente de las células dérmicas y epidérmicas. Los compuestos ingeridos se encuentran, en efecto, en el plasma y finalmente en varios tejidos, entre ellos la piel (Richelle *et al.*, 2006). La piel humana contiene de media de 0,2 a 0,6 ng/g de carotenoides totales, con grandes variaciones entre individuos y entre zonas del cuerpo (Stahl y Sies, 2007). La ingestión de una alimentación suplementada en carotenoides provoca un aumento del contenido de carotenoides en la dermis (Stahl *et al.*, 1998) y, para ser eficaces, estos últimos deben ser utilizados de forma prolongada, durante un periodo superior a 10 semanas (Stahl *et al.*, 2000).

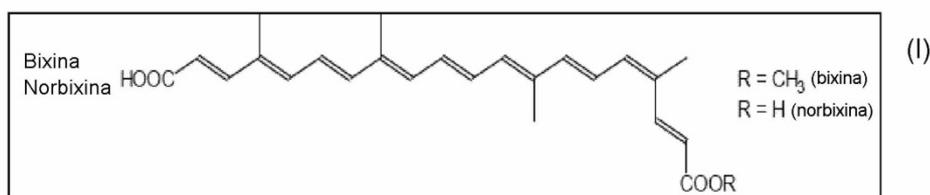
Dicho enfoque ha demostrado su eficacia con, por ejemplo, una mezcla (30 a 90 mg/día durante 24 semanas) de β - y α -caroteno (Lee *et al.*, 1999), aportando un extracto de toma 16 mg/día de licopeno durante 12 semanas (Stahl *et al.*, 2001; 2006) o aportando un extracto de algo (*Dunaliella salina*) 24 mg/día de β -caroteno o una mezcla (1:1:1) de β -caroteno, luteína y licopeno durante 12 semanas (Heinrich *et al.*, 2003). Los efectos protectores solo se desarrollan progresivamente, y la administración de una dosis simple de 120 mg o la de una dosis diaria de 90 mg de β -caroteno durante 23 días resultan ineficaces (Garmyn *et al.*, 1995). Sin embargo, Kläui *et al.* (1973), que proponen ingerir mezclas de carotenoides que contienen eventualmente bixina para proteger la piel contra la radiación UV, indican que un tratamiento que comienza 10 a 20 días antes de la exposición al sol es suficiente.

Los carotenoides son, de forma general, moléculas no tóxicas o poco tóxicas (Agner *et al.*, 2004), incluso con dosis crónicas de 3 g/kg en animales (Trumbo, 2005).

Exposición de la invención

El urucú (*Bixa Orellana*) pertenece a la familia de las bixáceas. Esta planta se presenta en forma de un árbol de 5 a 10 metros de altura, que en la extremidad de las ramas tiene frutos en forma de vainas que contienen granos rodeados de una pulpa coloreada de rojo anaranjado. El urucú se utiliza para la fabricación de colorante alimentario, el anato (= E160b), que es una mezcla de carotenoides que contiene esencialmente bixina ($C_{25}H_{30}O_4$), un poco de norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$), así como varios compuestos secundarios relacionados (Mercadante *et al.*, 1997). La norbixina es un derivado producto de la hidrólisis alcalina de la bixina y es hidrosoluble. Se han descrito varios métodos de extracción del colorante a partir del pericarpio de los granos de urucú. Estos extractos no presentan toxicidad (Hagiwara *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2004). Las conclusiones del JEFCA (Joint WHO/FAO Executive Committee on Food and Additives) celebrado del 20-29 de junio de 2006 recomiendan una dosis diaria autorizada de 12 mg/kg de bixina para un extracto titulado de 92% de bixina y 0,6 mg/kg de norbixina para un extracto titulado de 91% de norbixina. El E160b se utiliza en el campo agroalimentario para colorear materias grasas (mantequilla, aceite, margarina), algunos quesos, arroz, etc.

Las fórmulas químicas de la bixina y de la norbixina se describen a continuación.



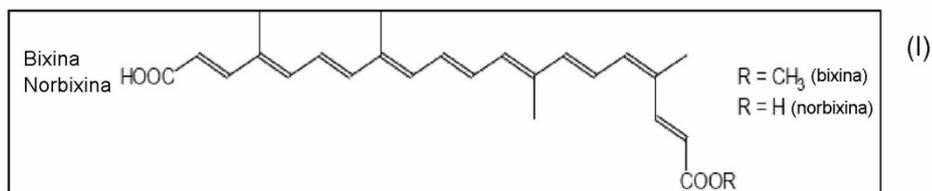
Los inventores han descubierto que el cultivo de explantes de epidermis humana durante una semana en presencia de bixina, norbixina o extracto de urucú (que contiene estas dos moléculas) conlleva una protección elevada frente a una irradiación UVB equivalente a aproximadamente 2 DEM. Esta protección se traduce por la disminución muy significativa del número de "células de quemadura solar" (*sunburn cells* o SBC) observadas 24 horas después de la irradiación (figura 1).

Los inventores han observado que la disminución del número de SBC era mayor bajo el efecto de la norbixina (-84,4%) que de la bixina (-74,4%) o del extracto de urucú (-63,9%). Este efecto de la norbixina se observa para una concentración de 15,5 ng·mL⁻¹ ($\approx 4 \cdot 10^{-8}M$).

Por otra parte, un estudio reciente ha demostrado una relación efecto-dosis de la actividad protectora de un extracto de urucú enriquecido con bixina de 166 ng·mL⁻¹, 330 ng·mL⁻¹ y 660 ng·mL⁻¹ frente a las alteraciones inducidas por una irradiación UV. Este estudio demuestra una reducción respectiva de 15% para 166 ng·mL⁻¹, de 42% para 330 ng·mL⁻¹ y de 63% para 660 ng·mL⁻¹.

Se sabe que la bixina ingerida se transforma en norbixina, que es el compuesto principal que se encuentra en el plasma después de la ingestión de bixina. Después de la ingestión de una disolución oleosa de anato que contiene 16 mg de bixina, se observan concentraciones plasmáticas de norbixina superiores a 25 ng·mL⁻¹ durante más de 6 horas, mientras que las de bixina no llegan más que a 10 ng·mL⁻¹ y esto durante menos de 4 horas (Levy *et al.* 1997).

- 5 La invención tiene por lo tanto como objetivo una utilización por vía oral de una primera molécula de fórmula (I) con R = CH₃ para prevenir los daños producidos por la exposición a la radiación ultravioleta sobre la piel de los mamíferos según la reivindicación 1.



- 10 En un modo de realización de la invención, la primera molécula se mezcla con una segunda molécula de fórmula (I) con R = H.

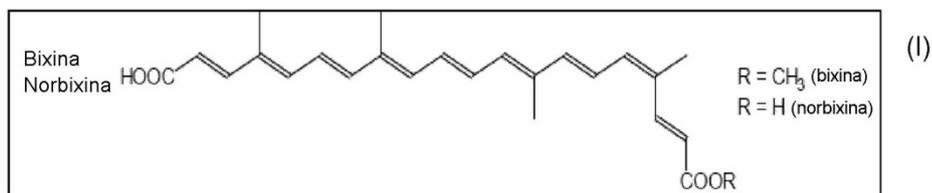
En un modo de realización de la invención, la primera molécula se ingiere con una dosis diaria comprendida entre 5 mg y 100 mg, preferentemente una dosis diaria de 35 mg.

En un ejemplo, la dosis diaria puede estar entre 30 y 40 mg para una persona de aproximadamente 70 kg.

- 15 En otro modo de realización de la invención, la segunda molécula se ingiere con una dosis diaria comprendida entre 5 mg y 100 mg, preferentemente con una dosis diaria de 35 mg.

La invención tiene igualmente como objetivo una composición destinada a ser administrada por vía oral, para la protección de la piel de los mamíferos contra la radiación UV, caracterizada por que comprende, en un soporte aceptable para ser ingerido, una primera molécula de fórmula (I) con R = CH₃ con una dosis mínima de 0,01% en peso de esta primera molécula hasta una dosis máxima de 92% en peso de esta misma primera molécula.

- 20 En ejemplos, la dosis puede ser de 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% y 90%.



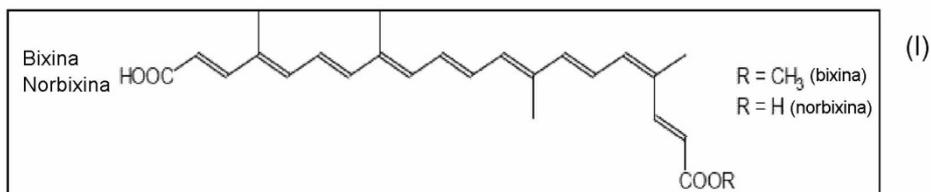
En un modo de realización de la invención, la composición contiene igualmente una segunda molécula de fórmula (I) con R = H.

- 25 En un modo de realización de la invención, la composición comprende una dosis mínima de 0,001% en peso de la segunda molécula hasta una dosis máxima de 92% en peso de esta misma segunda molécula. En ejemplos, la dosis puede ser de 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% y 90%.

- 30 En un modo de realización de la invención según la reivindicación 7, la primera molécula se aporta en forma de un extracto de urucú enriquecido en la primera molécula de fórmula (I) con R = CH₃.

El extracto de urucú comprende entre 2% y 92% en peso de la primera molécula, preferentemente al menos 6% en peso de la primera molécula.

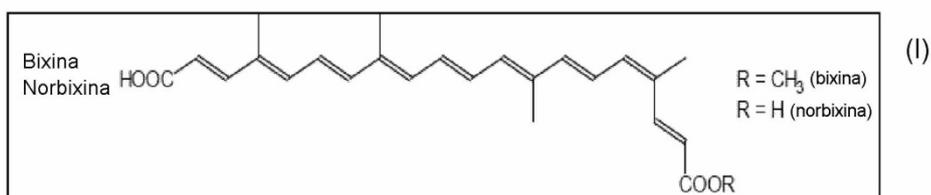
En un modo de realización de la invención, la segunda molécula se aporta en forma de un extracto de urucú enriquecido en la segunda molécula de fórmula (I) con R = H.



En un modo de realización de la invención, el extracto comprende entre 2% y 92% en peso de la segunda molécula, preferentemente al menos 6% en peso de la segunda molécula.

5 En un modo de realización de la invención, la composición se realiza como medicamento o complemento alimentario o alimento.

La invención tiene igualmente como objetivo un extracto de urucú, caracterizado por que está enriquecido en una primera molécula de fórmula (I) con R = CH₃, cuyo extracto contiene entre 2% y 92% en peso, y preferentemente al menos 6% en peso, de la primera molécula.



10 En un modo de realización de la invención, el extracto está igualmente enriquecido en una segunda molécula de fórmula (I) con R = H, cuyo extracto contiene entre 2% y 92% en peso, y preferentemente al menos 6% en peso, de la segunda molécula.

Por último, la invención tiene como objetivo el extracto descrito anteriormente para formular la composición descrita anteriormente.

15 La primera molécula de fórmula (I) con R = H se denomina norbixina.

La segunda molécula de fórmula (I) con R = CH₃ se denomina bixina.

La cantidad de bixina o de norbixina recomendada por día es de 35 mg (en dos tomas) para obtener un efecto de protección contra la radiación solar. Esta posología está aconsejada para una persona que pesa aproximadamente 70 kg.

20 El porcentaje inferior en peso de la norbixina o de la bixina se determina en función de una concentración mínima de norbixina o de bixina. La concentración mínima de norbixina o de bixina es una concentración de norbixina o de bixina que está por debajo de la que la norbixina o la bixina según la invención no tienen un efecto biológico o un efecto fotoprotector.

25 La norbixina o la bixina se pueden obtener por extracción a partir de plantas que contienen norbixina o bixina. La planta que se usa preferentemente para extraer la norbixina o la bixina es el urucú.

30 Por composición se entiende un producto alimentario, tal como una bebida, un producto lácteo u otro. La composición puede ser una composición medicinal, por ejemplo utilizada en forma de píldoras, de cápsulas o de comprimidos, que contienen una dosis muy precisa de la primera molécula de fórmula (I) con R = H. Por composición medicinal se entiende una composición que presenta propiedades preventivas frente a la radiación solar sobre la piel de un mamífero.

La composición contiene entre 2% y 92% en peso de la primera molécula o de la segunda molécula, y preferentemente al menos 6% en peso de la primera molécula o de la segunda molécula.

Por enriquecido se entiende que el extracto comprende la primera molécula o la segunda molécula en una cantidad tal como la que se obtiene según los procedimientos de preparación del extracto descritos a continuación.

35 La composición de cápsulas, por ejemplo, que comprenden el extracto enriquecido se realiza de forma que una cápsula contiene 17,5 mg de bixina o de norbixina. Utilizándose fécula de mandioca para completar la fórmula. Esta puede ser, por ejemplo, 250 mg de un extracto de urucú al 7% de bixina y 263 mg de fécula de mandioca.

El porcentaje en peso de norbixina o de bixina presente en el extracto de urucú se determina en función de una concentración inferior umbral de norbixina o de bixina por debajo del cual no se observa ningún efecto (positivo o

negativo) . El porcentaje en peso de norbixina o de bixina presente en este extracto se determina también en función de una concentración superior umbral por encima de la que pueden aparecer efectos nocivos para la salud o para el organismo (inhibición del efecto fotoprotector, efecto tóxico,...) al ingerir este extracto.

5 Como se ha mencionado anteriormente, por composición se entiende, por ejemplo, un producto alimentario, tal como una bebida, un producto lácteo u otro. La composición puede ser una composición medicinal, por ejemplo utilizada en forma de píldoras, de cápsulas o de comprimidos que contienen una dosis muy precisa de extracto enriquecido en norbixina o en bixina. Por composición medicinal se entiende una composición que presenta propiedades preventivas frente a la radiación solar sobre la piel de un mamífero.

10 La norbixina, la bixina o el extracto enriquecido de urucú según las reivindicaciones 1, 3, 7 y 9 pueden ser ingeridos en forma de una cápsula, de un comprimido o de una píldora o pueden mezclarse con un producto alimentario como un queso o un yogur o un producto lácteo.

15 “Complemento alimentario” tiene el significado dado por la directiva europea 2002/46/CE, es decir cualquier producto alimentario cuyo objetivo es el de completar el régimen alimentario normal y que constituye una fuente concentrada de nutrientes o de otras sustancias que tienen un efecto nutricional o fisiológico, solos o combinados, comercializados en forma de dosis, es decir, en formas de presentación tales como las cápsulas, las pastillas, los comprimidos, las píldoras y otras formas similares, así como los sobres de polvos, las ampollas de líquido, los frascos provistos de cuentagotas y las otras formas análogas de preparaciones líquidas o en polvo destinadas a ser tomadas en unidades medidas de pequeña cantidad.

20 “Alimento” tiene el significado dado en el artículo 2 del reglamento europeo 178/2002 del Parlamento Europeo. Se entiende por “alimento” cualquier sustancia o producto, transformado, parcialmente transformado o no transformado, destinado a ser ingerido o razonablemente susceptible de ser ingerido por el ser humano. Este término incluye las bebidas, los chicles y cualquier sustancia, incluida el agua, integrada intencionalmente en los productos alimentarios en el transcurso de su fabricación, de su preparación o de su tratamiento. Incluye el agua hasta el punto de conformidad definido en el artículo 6 de la directiva 98/83/CE, sin perjuicio de las exigencias de las directivas 80/778/CEE y 98/83/CE. El término “alimento” no incluye:

- los alimentos para animales;
- los animales vivos, a menos que se preparen con vistas al consumo humano;
- las plantas antes de su recolección;
- los medicamentos, en el sentido de las directivas 65/65/CEE (21) y 92/73/CEE (22) del Consejo;
- 30 - los cosméticos, en el sentido de la directiva 76/768/CEE del Consejo (23);
- el tabaco y los productos del tabaco, en el sentido de la directiva 89/622/CEE del Consejo (24);
- los estupefacientes y las sustancias psicotrópicas, en el sentido de la Convención única de las Naciones Unidas sobre los estupefacientes de 1961 y de la Convención de las Naciones Unidas sobre las sustancias psicotrópicas de 1971;
- 35 - los residuos y los contaminantes.

40 “Medicamento” tiene el significado dado por la directiva europea 65/65/CE, es decir cualquier sustancia o composición presentada como que tiene propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades humanas o animales y/o cualquier sustancia o composición que pueda ser administrada a humanos o animales con vistas a establecer un diagnóstico médico o a restaurar, corregir o modificar funciones orgánicas en humanos o en animales es considerada igualmente como medicamento.

Breve descripción de la figura

Figura 1: efectos de un extracto de urucú enriquecido en bixina, de la bixina y de la norbixina sobre el número de “células de quemadura solar” después de una irradiación de la piel por radiación UVB.

1) Ejemplo del procedimiento de preparación del extracto de urucú enriquecido en bixina

45 A 200 kg de granos de urucú se le añaden 400 litros de etanol absoluto. Se realiza una primera extracción por agitación durante 16 horas. Se realiza una separación por centrifugación y se obtienen 400 litros de un primer extracto de líquido A. Los residuos se vuelven a extraer con 400 litros de etanol absoluto. Los dos extractos (800 litros) se mezclan y este volumen se reduce a 80 litros; se añaden 10 kg de fécula de mandioca y el conjunto se seca por atomización: se obtienen así 30 kg de un extracto seco.

50 2) Ejemplo de procedimiento de preparación de un extracto de urucú enriquecido en norbixina.

La preparación del extracto enriquecido en norbixina se hace por saponificación del extracto rico en bixina por agitación en una disolución acuosa de NaOH (bixina:NaOH 1:3 mol/mol) durante varias horas a 37°C. Las muestras de la reacción de saponificación pueden ser analizadas por HPLC hasta una conversión bixina/norbixina próxima al 100%. El secado se realiza por evaporación del agua a 50°C y la norbixina así cristalizada se puede guardar a -20°C (Kovary *et al.*, 2001).

3) Estudio experimental del efecto de un extracto de urucú enriquecido en bixina, de la bixina y de la norbixina (figura 1).

Después de tratamiento e irradiación con radiación UVB de explantes de piel humana *ex vivo*, la coloración con tricromo de Masson permite la visualización y el recuento de las SBC.

3.1.- Productos ensayados:

- P1: extracto de urucú bio titulado de 6% de bixina (330 ng·mL⁻¹)
- P2: bixina pura (15,5 ng·mL⁻¹)
- P3: norbixina pura (15,5 ng·mL⁻¹)

3.2.- Preparación de los explantes

Se han preparado 27 explantes con un diámetro de aproximadamente 10 mm a partir de una plastia abdominal. Los explantes se han puesto en subsistencia en un medio de cultivo a 37°C en atmósfera húmeda que contenía 5% de CO₂.

Estos explantes se han repartido en 9 lotes como sigue:

Lote	Nº de explantes	Tratamiento	UV	Toma de muestras
Testigo D0	3	Ninguno	-	D0
Testigo	3	Ninguno	-	D8
Extracto urucú	3	Urucú	-	D8
Bixina	3	Bixina	-	D8
Norbixina	3	Norbixina	-	D8
Testigo UV	3	Ninguno	+	D8
Extracto urucú UV	3	Extracto urucú UV	+	D8
Bixina UV	3	Bixina UV	+	D8
Norbixina UV	3	Norbixina UV	+	D8

3.3.- Tratamiento

El extracto de urucú se ha puesto en disolución en DMSO. Los tres productos se han añadido en el medio de cultivo en el primer día (D0), de forma que se alcancen las concentraciones finales deseadas. La cantidad final de DMSO en el medio siempre ha sido inferior a 1%.

Los explantes del lote T: testigo no han recibido ningún tratamiento.

3.4.- Irradiación UV

En el día D7, los explantes han sido expuestos a radiación UVB con una dosis de 0,30 J/cm² y a radiación UVA con una dosis de 9 J/cm². Los lotes no irradiados han sido colocados en la oscuridad durante el tiempo de irradiación. Desde el final de la irradiación, los explantes han vuelto a ser puestos en subsistencia en el medio de cultivo.

3.5.- Toma de muestras

En el día D0, los 3 explantes del lote Testigo T0 han sido extraídos y cortados en dos. Una parte ha sido fijada con disolución de Bouin normal para la observación de la morfología general. La otra ha sido congelada y conservada a -80°C.

En el día D8, es decir 24 horas después de la irradiación, los 3 explantes de cada lote han sido extraídos y tratados

de la misma forma.

3.6.- *Histología*

5 Después de 48 horas de fijación en disolución de Bouin normal, las muestras han sido deshidratadas e impregnadas en parafina por medio de un dispositivo automático de deshidratación Leica 1020. Las observaciones microscópicas han sido realizadas por microscopía óptica, por medio de un microscopio Leica tipo DMLB, con un objetivo x40.

- Examen de la morfología general de las células de quemadura solar

La observación de la morfología general se ha realizado en cortes en parafina después de coloración con tricromo de Masson, variante de Goldner.

- Recuento de las células de quemadura solar (SBC), figura 1.

10 Se han contabilizado las células de quemadura solar (SBC) a lo largo de cada epidermis. La longitud de cada epidermis se ha medido por medio del módulo de medida del programa Leica IM1000 y a continuación se ha calculado el número de SBC por cm.

- Número de SBC por cm

	No irradiado		Irradiado	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Testigo no tratado	0,6	0,4	163,8	20,5
P1 (extracto de urucú)	1,0	0,1	59,7	14,5
P2 (bixina)	0,3	0,4	41,9	6,1
P3 (norbixina)	0,3	0,4	25,5	8,7

15 No se ha observado ningún SBC a T0.

Después de 7 días de tratamiento y exposición a la radiación ultravioleta, el producto P1, el producto P2 y el producto P3 conllevan respectivamente una disminución significativa de 63,9%, 74,4% y 84,4% del número de SBC en la epidermis con respecto a la epidermis testigo no tratada e irradiada.

Referencias bibliográficas

Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius 29º período de sesiones Ginebra, Suiza, 3-7 de julio de 2006.

Informe de la séptima reunión del comité del Codex sobre la leche y los productos lácteos Queenstown, Nueva Zelanda 27 de marzo- 1º de abril de 2006. Summary and conclusions of the sixty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) page 2 of 11 issued July 2006.

FDA Code of Federal Regulations. Title 21, Volume 1 Revised as of April 1, 2002. From the U.S. Government Printing Office via GPO Access [CITE: 21CFR73.30] Sec. 73.30 Annatto extract [Pages 346-347]

Agner A.R., Barbisan L.F., Scolastici C., Salvadori D.M. 2004. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1687-1693.

Bautista A.R.P.L., Moreira E.L.T., Batista M.S., Miranda M.S., Gomes I.C.S. 2004. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. *Food Chem. Toxicol.* 42, 625-629.

Biesalski H.K., Obermueller-Jevic U.C. 2001. UV light, beta-carotene and human skin – beneficial and potentially harmful effects. *Arch. Biochem. Biophys.* 389, 1-6.

Corol D-I., Dorobantu I.I., Toma N., Nitu R. 2003. Diversity of biological functions of carotenoids. *Romanian Biotechnol. Lett.* 8, 1067- 1074.

Fernandes A.C.S., Almeida C.A., Albano F., Laranja G.A.T., Felzenswalb I., Lage C.L.S., de Sa C.C.N.F., Moura A.S., Kovary K. 2002. Norbixin ingestion did not induce any detectable DNA breakage in liver and kidney but caused a considerable impairment in plasma glucose levels of rats and mice. *J. Nutr. Biochem.* 13, 411-420.

Garmyn M., Ribaya-Mercado J.D., Russell R.M., Bhawan J., Gilchrist B.A. 1995. Effect of β -carotene supplementation on human sunburn reaction. *Exp. Dermatol.* 4, 104-111.

Grollier J.F., Cotteret J., Rosenbaum G. 1991. Light-stable screening cosmetic composition containing bixin combined with a lipid-soluble UV filter

and its use for protecting the human epidermis against ultra-violet radiation. Patent WO/5,032,382.

Hagiwara A., Imai N., Ichibara T., Sano M., Tamano S., Aoki H., Yasuhara K., Koda T., Nakamura M., Shirai T. 2003. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1157-1164.

Heinrich U., Gärtner C., Wiebusch M., Eichler O., Sies H., Tronnier H., Stahl W. 2003. Supplementation with β -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects Humans from UV-induced erythema. *J. Nutr.* 133, 98-101.

Júnior A.C.T.S., Asad L.M.B.O., de Oliveira E.B., Kovary K., Asad N.R., Felzenszwalb I. 2005. Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genet. Mol. Res.* 4, 94-99.

Kiokias S. and Gordon M.H. 2003. Dietary supplementation with a natural carotenoid mixture decreases oxidative stress. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 1135-1140.

Kläui H., Körner, W.F. 1973. Light-screening composition and method. US Patent 3,920,834.

Kovary K., Louvain T.S., Costa e Silva M.C., Albano F., Pires B.B.M., Laranja G.A.T., Lage C.L.S., Felzenszwalb I. 2001. Biochemical behaviour of norbixin during *in vitro* DNA damage induced by reactive oxygen species. *Br. J. Nutr.* 85, 431-440.

Levy L.W., Regalado E., Navarrete S., Watkins RH. 1997. Bixin and norbixin in human plasma: determination and study of the absorption of a single dose of Annatto food color. *Analyst* 122, 977-980.

Levy P.E., Levy L.W. 2003. Supplements containing annatto extracts and carotenoids and methods for using the same. Patent WO03/047528 A2.

Mercadante A.Z., Steck A., Pfander H. 1997. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Phytochemistry* 46, 1379-1383.

Richelle M., Sabatier M., Steiling H., Williamson G. 2006. Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. *Br. J. Nutr.*, 96, 227-238.

Russell K.R.M., Morrison E.Y.St.A., Ragoobirsingh D. 2005. The effect of annatto on insulin binding properties in the dog. *Phytother. Res.* 19, 433-436.

Sies H., Stahl W. 1995. Vitamins E and C, β carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1315S-1321S.

Sies H., Stahl W. 2004. Carotenoids and UV protection. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3, 749-752.

Silva C.R., Antunes L.M.G., Bianchi M.D.L.P. 2001. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol. Res.* 43, 561-566.

Stahl W., Heinrich U., Jungmann H., von Laar J., Schietel M., Sies H., Tronnier H. 1998. Increased dermal carotenoid levels assessed by noninvasive reflection spectrophotometry correlate with serum levels in women ingesting betatene. *J. Nutr.* 128, 903-907.

Stahl W., Heinrich U., Jungmann H., Sies H., Tronnier H. 2000. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 795-798.

Stahl W., Heinrich U., Wiseman S., Eichler O., Sies H., Tronnier H. 2001. Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans. *J. Nutr.* 131, 1449-1451.

Stahl W., Heinrich U., Aust, O., Tronnier H., Sies H. 2006. Lycopene-rich products and dietary photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 238-242.

Stahl W., Sies H. 2007. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Mol. Biotechnol.* 37, 26-30.

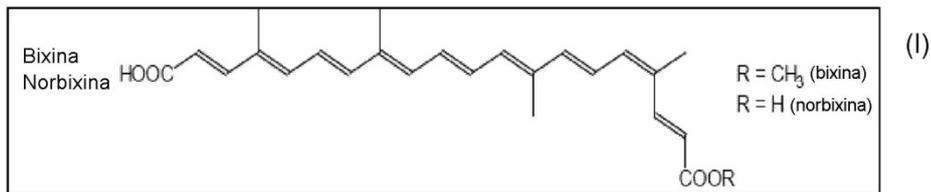
Thresiamma K.C., George J., Kuttan R. 1998. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 4, 431-43.

Trumbo P.R. 2005. Are there adverse effects of lycopene exposure? *J. Nutr.* 135, 2060S-2061S.

Young A.J., Lowe G.M. 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 20-27.

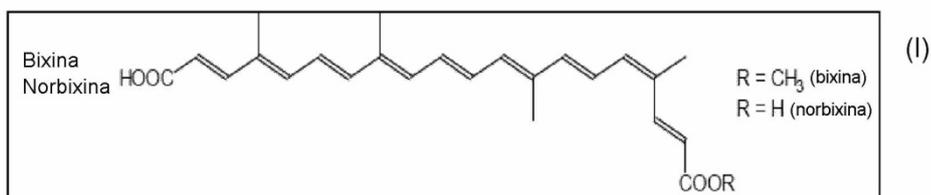
REIVINDICACIONES

1.- Primera molécula de fórmula (I) con R = CH₃ para su uso para prevenir los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta sobre la piel de los mamíferos, caracterizada por que se administra por vía oral.



5 2.- Primera molécula de fórmula (I) con R = CH₃ según la reivindicación 1 para su uso por vía oral para prevenir los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta sobre la piel de los mamíferos, caracterizada por que dicha primera molécula se mezcla con una segunda molécula de fórmula (I) con R = H.

3.- Primera molécula de fórmula (I) con R = H para su uso para prevenir los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta sobre la piel de los mamíferos, caracterizada por que se administra por vía oral.

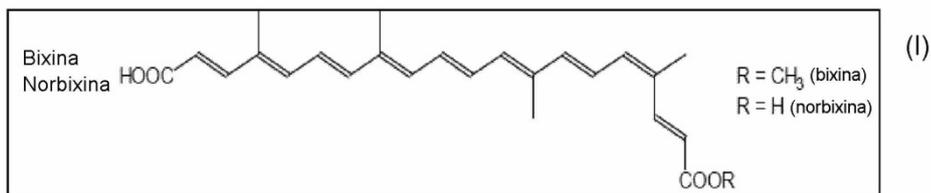


10 4.- Primera molécula de fórmula (I) con R = H según la reivindicación 3, para su uso por vía oral para prevenir los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta sobre la piel de los mamíferos, caracterizada por que dicha primera molécula se mezcla con una segunda molécula de fórmula (I) con R = CH₃.

15 5.- Primera molécula de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 a 2 o según una de las reivindicaciones 3 a 4, para su uso por vía oral para prevenir los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta sobre la piel de los mamíferos, por ingestión de una dosis diaria de dicha primera molécula comprendida entre 5 mg y 100 mg, preferentemente una dosis diaria de 35 mg.

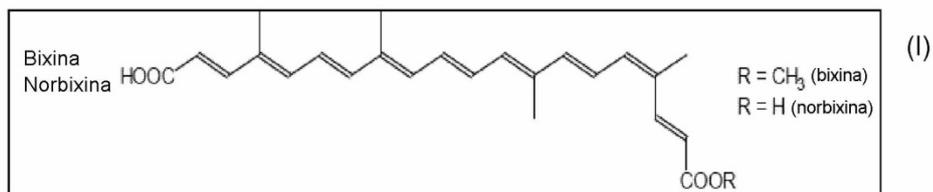
20 6.- Primera molécula de fórmula (I) según la reivindicación 2 o según la reivindicación 4, para su uso por vía oral para prevenir los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta sobre la piel de los mamíferos, por ingestión de una dosis diaria de dicha segunda molécula comprendida entre 5 mg y 100 mg, preferentemente una dosis diaria de 35 mg.

7.- Extracto de urucú que comprende entre 2% y 92% en peso de una primera molécula de fórmula (I) con R = CH₃, para su uso para prevenir los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta sobre la piel de los mamíferos, caracterizado por que se administra por vía oral.



25 8.- Extracto de urucú según la reivindicación 7, comprendiendo dicho extracto igualmente entre 2% y 92% en peso de una segunda molécula de fórmula (I) con R = H.

30 9.- Extracto de urucú que comprende entre 2% y 92% en peso de una primera molécula de fórmula (I) con R = H, para su uso para prevenir los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta sobre la piel de los mamíferos, caracterizado por que se administra por vía oral.



10.- Extracto de urucú según la reivindicación 9, comprendiendo dicho extracto igualmente entre 2% y 92% en peso de una segunda molécula de fórmula (I) con R = CH₃.

5 11.- Extracto de urucú según una de las reivindicaciones 7 a 8 o según una de las reivindicaciones 9 a 10, comprendiendo dicho extracto al menos 6% en peso de la primera molécula.

12.- Extracto de urucú según la reivindicación 8 o según la reivindicación 10, comprendiendo dicho extracto al menos 6% en peso de la segunda molécula.

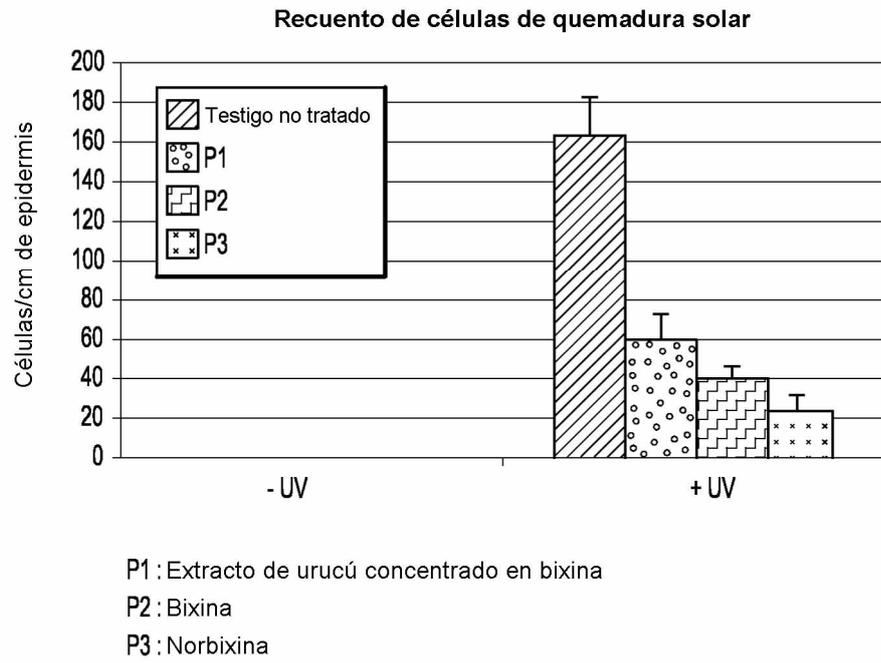


Fig. 1