

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 689**

51 Int. Cl.:

A61K 8/65 (2006.01)
A61K 8/34 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61K 8/66 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A23L 5/00 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
A23L 33/18 (2006.01)
A23L 33/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2015** **E 15177511 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 2979684**

54 Título: **Suplemento nutricional antioxidante antienvjecimiento para la mejora del sistema integumentario**

30 Prioridad:
30.07.2014 IT TO20140608

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2019

73 Titular/es:
MINERVA RESEARCH LABS LTD (100.0%)
1-6 Yarmouth Place
London W1J 7BU, GB

72 Inventor/es:
SANGUINETTI, CATONE TONY;
AUNG, THEIN;
SIBILLA, SARA y
PATEL, VIDHI

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 730 689 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

Suplemento nutricional antioxidante antienviejecimiento para la mejora del sistema integumentario

Campo de la invención

- 5 La presente divulgación se refiere a un suplemento nutricional particularmente adecuado para contrarrestar el daño oxidativo en el sistema integumentario.

Antecedentes de la invención

La tensión oxidativa se define como una perturbación en el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes (Finkel y Holbrook 2000), (Kunwar et al, 2011).

- 10 Las ROS son moléculas que contienen moléculas reactivas con el oxígeno; ejemplos de ROS incluyen radicales libres, iones de oxígeno y peróxidos.

Las ROS se forman como un subproducto natural del metabolismo normal del oxígeno y tienen funciones importantes en la señalización celular y la homeostasis.

Las ROS también pueden actuar impulsando varias vías moleculares que desempeñan papeles importantes en diferentes afecciones patológicas tales como cáncer, enfermedades cardíacas y diabetes.

- 15 La sobreproducción de peróxidos y radicales libres conduce a daños en los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN. Además, algunas ROS pueden actuar como mensajeros celulares en la señalización de reducción/oxidación (redox) entre las células. Por lo tanto, la tensión oxidativa puede causar interrupciones en los mecanismos normales de señalización celular.

- 20 Por lo tanto, el uso de oxígeno por las células de organismos aeróbicos genera metabolitos de oxígeno reactivos potencialmente perjudiciales.

La cantidad de daño oxidativo puede aumentar con la edad de un organismo y puede ser un factor importante capaz de causar senescencia (Sohal y Weindruch 1996).

El punto principal que surge de los estudios de investigación es que el daño oxidativo molecular durante el envejecimiento es ubicuo, significativo y aumenta exponencialmente con la edad.

- 25 Las principales causas de un aumento asociado con la edad en la cantidad de tensión oxidativa se pueden vincular a un aumento en la tasa de generación de metabolitos reactivos de oxígeno (ROM), una disminución en las defensas antioxidantes, una disminución en la eficiencia de reparación o eliminación de moléculas dañadas.

La producción de peróxido de hidrógeno por parte de las mitocondrias es también una de las principales fuentes de tensión oxidativa y en los mamíferos aumenta con la edad en varios órganos diferentes (Turrens y McCord 1990).

- 30 Un estudio reciente ha investigado el efecto del género, la edad y el tiempo de tratamiento en la tensión oxidativa cerebral y los déficits de memoria espacial inducidos por la d-galactosa (d-gal) en ratones. Los ratones hembras no mostraron deterioro de la memoria espacial, incluso en la presencia de mayores cantidades de especies de oxígeno reactivas en el cerebro (ROS). En contraste, los ratones machos que recibieron la misma cantidad de d-gal mostraron déficits de memoria espacial y un aumento significativo en los marcadores de tensión oxidativa (Hao et al, 2014).

- 35 Curiosamente, otro estudio reciente publicado en 2014, reclutó a un total de 478 trabajadores (272 hombres y 206 mujeres) de una planta de horno de coque. El estudio encontró que las mujeres eran más susceptibles que los hombres a la tensión oxidativa y al daño cromosómico inducido por los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), lo que agrega evidencia potencial subyacente a las diferencias de género en la carcinogénesis pulmonar relacionada con la exposición a HAP (Guo et al, 2014).

- 40 La piel, junto con el cabello y las uñas, es el órgano principal del sistema integumentario y representa la primera y principal barrera para el medio ambiente externo.

- 45 En la piel, el daño de los radicales libres puede causar el deterioro del tejido conjuntivo de soporte, dando como resultado una elasticidad y resistencia disminuidas. La tensión oxidativa, además, puede alterar la función del folículo piloso, causando alopecia androgenética (patrón de calvicie) en hombres y mujeres.

La exposición de la piel a la radiación ultravioleta solar inicia reacciones fotoquímicas que conducen a la formación de ROS y, cuando su producción se sale de control, se produce una tensión oxidativa. Cuando esto sucede, las ROS (junto con las enzimas liberadas de los gránulos dentro de los glóbulos blancos) dañan o incluso matan las células, dañan el ADN y atacan a las enzimas y otros compuestos.

La piel posee mecanismos de defensa que interactúan con los tóxicos y contrarrestan su efecto perjudicial (como las moléculas no enzimáticas y enzimáticas que funcionan como potentes antioxidantes).

Estas defensas, aunque altamente efectivas, tienen una capacidad limitada y pueden ser superadas, lo que lleva a un aumento de los niveles de ROS y al desarrollo de enfermedades dermatológicas.

- 5 En general, se acepta que existe una correlación entre el envejecimiento y la acumulación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos dañados por oxidación (Levine y Stadtman 2001).

Un estudio reciente ha demostrado que la exposición de la piel a diversos agentes ambientales físicos y químicos induce una tensión oxidativa que conduce a la inducción de la peroxidación lipídica cutánea con modulación concomitante en los niveles de antioxidantes y enzimas metabolizadoras de fármacos.

- 10 Un enfoque para prevenir o tratar estos trastornos mediados por ROS se basa en la administración de diferentes antioxidantes en los que el término antioxidante se refiere a cualquier molécula capaz de estabilizar o desactivar los radicales libres antes de que causen daño en las células sanas. La publicación científica Liang J, Pei X, Zhang Z, Wang N, Wang J, Li Y. (2010) J Food Sci. 75 (8): H230-8 divulga propiedades protectoras y antioxidantes del hidrolizado de colágeno marino en la piel envejecida de ratas macho Sprague-Dawley.

15 Sumario de la invención

El propósito de la presente descripción es proporcionar un suplemento nutricional con una alta capacidad antioxidante que sea capaz de retardar el proceso de envejecimiento natural al contrarrestar la formación de radicales libres en el cuerpo a través de los efectos sinérgicos ejercidos por los ingredientes activos.

- 20 De acuerdo con la invención, el objetivo anterior se logra gracias al tema tratado específicamente en las reivindicaciones subsiguientes. La presente invención proporciona un suplemento nutricional que comprende colágeno hidrolizado, carnosina, CoEnzima Q10 y Resveratrol. La presente invención proporciona además un uso no terapéutico del suplemento nutricional para reducir el daño oxidativo al sistema integumentario. En una realización, el suplemento nutricional comprende además una emulsión que comprende aceite de semilla de borraja y aceite de onagra.

- 25 En otra realización, el suplemento nutricional comprende al menos un ingrediente adicional seleccionado entre ácido hialurónico, extracto de pimienta negra, licopeno.

En una realización adicional, el suplemento nutricional aquí descrito también incluye al menos uno de baya de acai, granada, vitaminas, preferiblemente vitamina C y vitamina A.

- 30 En un aspecto, el complemento alimenticio aquí descrito también incluye minerales, aditivos y sustancias aromatizantes.

Breve descripción del dibujo.

- La Figura 1 muestra un diagrama del proceso de fabricación de una realización de un suplemento nutricional divulgado en la presente descripción.
- La Figura 2 muestra el efecto de los ingredientes principales del suplemento nutricional en la síntesis de MMP-1 por fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF). La MMP-1 se midió en sobrenadantes de NHDF cultivados en placas de 24 pocillos y se incubó en medio (0) más varias combinaciones de ingredientes principales de suplementos nutricionales (véase las tablas 5 y 6 para la descripción de las adiciones) durante 48 horas. Los datos se expresaron como % de control de medios, normalizados al 100% en cada experimento y se presentan como promedio $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes. * indica $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$. El medio es de $5,6 \pm 1,7$ ng/ml.
- La Figura 3 muestra el efecto de los ingredientes principales del suplemento nutricional en la síntesis de MMP-3 por fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF). La MMP-3 se midió en sobrenadantes de NHDF cultivados en placas de 24 pocillos y se incubó en medio (0) más varias combinaciones de ingredientes principales de suplementos nutricionales (véase las tablas 5 y 6 para la descripción de las adiciones) durante 48 horas. Los datos se expresaron como % de control de medios, normalizados al 100% en cada experimento y se presentan como promedio $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes. * indica $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. El control de los medios es de $0,6 \pm 0,3$ ng/ml.

Descripción detallada de la invención

- 50 Una realización de la presente divulgación proporciona un suplemento nutricional que comprende colágeno hidrolizado, carnosina (preferiblemente L-carnosina), CoEnzima Q10 y Resveratrol (preferiblemente T-resveratrol).

El suplemento nutricional aquí descrito está dotado de una alta capacidad antioxidante y es capaz de reducir el daño oxidativo y mejorar el sistema integumentario.

En particular, ejerce una mejora en el estado de la piel al aumentar la hidratación y la elasticidad, al disminuir la

profundidad y la superficie total de las arrugas, al mantener la piel, cabello y uñas saludables.

El suplemento nutricional aquí descrito se puede realizar tanto en forma líquida como sólida, es decir, mezclando los ingredientes en forma sólida o liofilizando la preparación líquida.

- 5 El suplemento nutricional aquí descrito comprende colágeno hidrolizado en una cantidad entre 0,5 y 10 g/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 1,75 y 7,5 g/50 ml, más preferiblemente en una cantidad entre 3 y 5 g/50 ml.

El colágeno utilizado en el suplemento nutricional líquido es colágeno hidrolizado, preferiblemente derivado de una fuente de pescado.

La carnosina, preferiblemente L-carnosina, está presente en una cantidad entre 10 y 250 mg/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 20 y 160 mg/50 ml, más preferiblemente en una cantidad entre 40 y 80 mg/50 ml.

- 10 La CoEnzima Q10 está presente en una cantidad entre 5 y 250 mg/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 9 y 200 mg/50 ml, más preferiblemente en una cantidad entre 15 y 150 mg/50 ml.

El resveratrol, preferiblemente T-resveratrol, está presente en una cantidad entre 0,2 y 450 mg/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 1 y 200 mg/50 ml, más preferiblemente en una cantidad entre 2 y 80 mg/50 ml.

- 15 El colágeno es el componente principal de la piel junto con la elastina y el ácido hialurónico y tiene un papel clave en el suministro de integridad y elasticidad.

Sin embargo, el colágeno disminuye con la edad y conduce a una pérdida de la elasticidad de la piel y a la formación de líneas finas y arrugas.

- 20 El colágeno hidrolizado presente en el suplemento nutricional aquí divulgado ayuda a estimular las células de fibroblastos para producir colágeno nuevo (tipo I y III), ácido hialurónico y elastina (componentes extracelulares en la dermis).

La L-carnosina es un bloque de construcción de proteínas que se produce naturalmente en el cuerpo. Está altamente concentrado en los músculos, el cerebro, el corazón y en muchas otras partes del cuerpo.

- 25 La Coenzima Q10 (CoQ10) es una sustancia similar a las vitaminas que se encuentra en todo el cuerpo, pero especialmente en el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas.

El T-resveratrol es un polifenol antioxidante que se encuentra en la piel de las uvas rojas y en otras frutas, así como en las raíces de la falopía japonesa (*Polygonum cuspidatum*).

- 30 Debido a los efectos sinérgicos ejercidos por sus ingredientes principales, es decir, colágeno hidrolizado, L-carnosina, Coenzima Q10 y T-resveratrol, el suplemento nutricional aquí descrito está dotado con una alta capacidad antioxidante y es capaz de reducir el daño oxidativo al sistema integumentario.

En particular, al contrarrestar la formación de radicales libres, ejerce una mejora en el estado de la piel al aumentar su elasticidad y firmeza, al disminuir la sequedad, la profundidad y la superficie total de las arrugas. También mantiene la piel, el cabello y las uñas saludables.

- 35 En otra realización, el suplemento nutricional comprende además una emulsión que comprende aceite de semilla de borraja y aceite de onagra.

La emulsión que comprende aceite de semilla de borraja y aceite de onagra puede estar presente en una cantidad entre 0,5 y 250 mg/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 2 y 200 mg/50 ml, más preferiblemente en una cantidad entre 5 y 150 mg/50 ml.

- 40 Al añadir la emulsión que comprende aceite de semilla de borraja y aceite de onagra, el suplemento descrito aquí muestra sorprendentemente un efecto potenciador sobre la suavidad y la hidratación de la piel.

En particular, la emulsión que comprende aceite de semilla de borraja y aceite de onagra contiene ácido gamma-linolénico (GLA), también denominado ácido graso omega-6, que puede mejorar la suavidad y la hidratación de la piel.

- 45 En otra realización, el suplemento nutricional comprende al menos un ingrediente adicional seleccionado entre ácido hialurónico, licopeno y extracto de pimienta negra.

El ácido hialurónico puede estar presente en una cantidad entre 0,5 y 100 mg/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 1 y 75 mg/50 ml, más preferiblemente en una cantidad entre 2 y 40 mg/50 ml.

El licopeno puede estar presente en una cantidad entre 0,01 y 40 mg/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 0,05 y 10 mg/50 ml, más preferiblemente en una cantidad entre 0,1 y 5 mg/50 ml.

El extracto de pimienta negra, conocido por mejorar la biodisponibilidad de varias sustancias al aumentar su absorción gastrointestinal, puede estar presente en una cantidad entre 0,2 y 3,5 mg/50 ml, preferiblemente entre 0,5 y 2,5 mg/50 ml, más preferiblemente en una cantidad entre 1 y 2 mg/50 ml.

- 5 El ácido hialurónico (HA) es un polisacárido de alto peso molecular (10-104 KDa), localizado en la matriz extracelular de los tejidos conectivos, principalmente en los tejidos conectivos blandos, en particular la piel. HA se forma por unidades alternas de ácido glucorónico y N-acetilglucosamina.

El licopeno pertenece a la familia de los carotenoides y está presente en muchas frutas y verduras.

- 10 Los presentes inventores encontraron que al agregar al menos uno de ácido hialurónico, licopeno y extracto de pimienta negra al suplemento nutricional, se obtuvo un efecto potenciador adicional en términos de hidratación de la piel, actividad antioxidante y biodisponibilidad de varias sustancias.

En una realización adicional de la presente divulgación, el suplemento nutricional también incluye al menos un ingrediente seleccionado entre baya de acai, granada, vitamina, preferiblemente vitamina C y vitamina A.

Otras vitaminas que pueden estar presentes en el suplemento nutricional son las vitaminas que se sabe que tienen un beneficio para la salud de los consumidores.

- 15 Preferiblemente, se seleccionan vitaminas adicionales del grupo que consiste en vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₃, vitamina B₆, vitamina B₁₂, vitamina D, biotina y otras vitaminas solubles en agua.

En una realización adicional de la presente divulgación, el suplemento nutricional aquí descrito también incluye minerales, aditivos y sustancias aromatizantes.

Los minerales pueden elegirse entre zinc y cobre.

- 20 El aditivo se selecciona preferiblemente entre ácido cítrico anhidro, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido DL-málico y sucralosa.

Las sustancias aromatizantes pueden seleccionarse entre los aceites esenciales de melocotón y lichi.

Se utilizaron lactonas, ésteres, alcoholes superiores alifáticos, cetonas, aldehídos aromáticos, alcoholes aromáticos, tioéteres, ácidos grasos, propilen glicol, etanol, glicerol (glicerina) para formular la base de sabor.

- 25 La Tabla 1 informa el intervalo de contenido de los ingredientes que pueden incluirse en el suplemento nutricional con base en agua como se describe anteriormente.

Tabla 1

Ingredientes	Intervalo de contenido/50 ml
Colágeno (colágeno de pescado hidrolizado)	0,5-10 g
L-carnosina	10-250 mg
CoEnzima Q10	5-250 mg
T-Resveratrol	0,2-450 mg
Ácido hialurónico	0,5-100 mg
Emulsión de aceite de onagra y borraja (20%)	0,5-250 mg
Licopeno	0,01-40 mg
Extracto de pimienta negra	0,2-3,5 mg
Extracto de Baya de acai	0-250 mg
Granda	0-250 mg
Vitamina C	0-400 mg
Vitamina A	0-400 mg

(continuación)

Ingredientes	Intervalo de contenido/50 ml
Otras vitaminas	0-400 mg
Minerales	0-2,5 mg
Sustancias aromatizantes	0-200 mg

A continuación se proporcionarán algunos ejemplos de diferentes realizaciones del objeto de suplemento nutricional de la presente descripción.

5 Ejemplo 1

El suplemento nutricional en forma líquida que comprende los ingredientes indicados en la Tabla 2 a continuación se ha preparado – de acuerdo con el diagrama del proceso de fabricación que se muestra en la Figura 1 - primero agregando ingredientes tal como agua, ácido hialurónico, colágeno de pescado hidrolizado, L-carnosina., N-acetilglucosamina, ácido cítrico anhidro, ácido DL-málico, extracto de pimienta negra, zinc, cobre, D-biotina, estevia, hidrocloreuro de piridoxina, polisacárido de soja, vitamina D3, jugo concentrado de granada, extracto de baya de acai, Coenzima Q10, licopeno, disueltos a una temperatura de $60 \pm 5^\circ\text{C}$ en el tanque (A) de mezcla. Luego se añadió vitamina C (ácido L-ascórbico) a la mezcla después de enfriar la temperatura a menos de 45°C . Luego se agregaron agua y T-Resveratrol al tanque (B) de mezcla a una temperatura de $60 \pm 5^\circ\text{C}$. En un paso siguiente, los ingredientes presentes en el tanque de mezcla (A) y (B) junto con las sustancias aromatizantes se agregaron al tanque de lote principal. Luego se agregaron agua, aceite de borraja y emulsión de aceite de onagra (20%), d- α -tocoferol y emulsión de β -caroteno en el tanque (B) de mezcla enfriando la temperatura hasta $25 \pm 5^\circ\text{C}$ y luego se agrega al tanque de lote principal. Después de mezclar todos los ingredientes, se agregó agua para ajustar el volumen a 50 ml. Se realizó un control de calidad para garantizar el pH, acidez, sabor y color correctos. En los pasos finales del procedimiento de fabricación, el producto pasó por pasos de filtración y pasteurización a $98 \pm 2^\circ\text{C}$, mantenido durante 30 segundos antes de enfriarse a $85 \pm 2^\circ\text{C}$ para el proceso de embotellado. Un segundo paso de pasteurización se realizó a $80 \pm 2^\circ\text{C}$, mantenido durante 30 segundos antes del empaquetado final.

Tabla 2

Ingredientes	Contenido de 50ml
Colágeno (colágeno de pescado hidrolizado)	5,00 g
L-Carnosina	60,0 mg
CoEnzima Q10	25,0 mg
T-Resveratrol	2,5 mg
Ácido Hialurónico	40,0 mg
Aceite de Onagra (<i>Oenothera biennis</i>), Aceite de Semilla de Borraja (<i>Borago Officinalis</i>) (Solvente: Glicerol, Emulsionante: Lecitina de Soja)	25,0 mg
Licopeno	0,10 mg
Extracto de pimienta negra (Bioperine®)	1,50 mg
Extracto de Baya de acai	30,0 mg
Granada	20,0 mg
Vitamina C (Ácido Ascórbico)	80,0 mg (100% NRV*)
Vitamina A (Betacaroteno)	150 pg (15% NRV*)
Vitamina D (D3)	5 μg (100% NRV*)

(continuación)

Ingredientes	Contenido de 50ml
Vitamina E (D-a-Tocoferol)	6,0 mg (50% NRV*)
Vitamina B6 (Clorhidrato de piridoxina)	1,65 mg (118% NRV*)
Cobre	0,15 mg (15% NRV*)
Biotina (D-Biotina)	50 µg (100% NRV*)
Zinc (gluconato)	1,50 mg (15% NRV*)
N-Acetilglucosamina	5,0 mg
Ácido Cítrico	450,0 mg
Polisacárido de soja	200,0 mg
Ácido málico	100,0 mg
Estevia	30,0 mg
Aromatizantes	0,2250 mg
Agua	43.873 g
*NRV= Valor de referencia de nutrientes	

La Tabla 3 a continuación muestra la información nutricional del suplemento descrito aquí.

Tabla 3

Información Nutricional	Contenido de 50ml
Energía	34 kcal (144 kJ)
Proteína	5,3 g
Carbohidratos (de los cuales azúcares)	0,0 g (0,0 g)
Grasa (de los cuales saturadas)	1,4 g (0,4g)
Fibra	0,0 g
Sodio	0,0 mg

5

El suplemento nutricional que está sustancialmente libre de carbohidratos puede ser asumido ventajosamente también por personas afectadas por diabetes.

Ejemplo 2

10 El suplemento nutricional en forma líquida que comprende los ingredientes indicados en la Tabla 4 a continuación se ha preparado – de acuerdo con el diagrama del proceso de fabricación que se muestra en la Figura 1 - primero agregando ingredientes tal como agua, ácido hialurónico, colágeno de pescado hidrolizado, L-carnosina, N-acetilglucosamina, ácido cítrico anhidro, ácido DL-málico, extracto de pimienta negra, zinc, cobre, D-biotina, estevia, hidrocloreto de piridoxina, polisacárido de soja, vitamina D3, jugo concentrado de granada, extracto de Baya de acai, Coenzima Q10, licopeno, disueltos a una temperatura de $60 \pm 5^\circ\text{C}$ en el tanque (A) de mezcla. Luego se añadió
15 vitamina C (ácido L-ascórbico) a la mezcla después de enfriar la temperatura a menos de 45°C . Luego se agregaron agua y T-Resveratrol al tanque (B) de mezcla a una temperatura de $60 \pm 5^\circ\text{C}$. En un paso siguiente, los ingredientes presentes en el tanque (A) y (B) de mezcla junto con las sustancias aromatizantes se agregaron al tanque de lote

- 5 principal. Luego se agregaron agua, aceite de borraja y emulsión de aceite de onagra (20%), d- α -tocoferol y emulsión de β -caroteno en el tanque (B) de mezcla enfriando la temperatura hasta $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ y luego se agrega al tanque de lote principal. Después de mezclar todos los ingredientes, se agregó agua para ajustar el volumen a 30 ml. Se realizó un control de calidad para garantizar el pH, acidez, sabor y color correctos. En los pasos finales del procedimiento de fabricación, el producto pasó por pasos de filtración y pasteurización a $98\pm 2^{\circ}\text{C}$, mantenido durante 30 segundos antes de enfriarse a $85\pm 2^{\circ}\text{C}$ para el proceso de embotellado. Un segundo paso de pasteurización se realizó a $80\pm 2^{\circ}\text{C}$, mantenido durante 30 segundos antes del empaquetado final.

Tabla 4

Ingredientes	Contenido de 30 ml
Colágeno (colágeno de pescado hidrolizado)	5,0 g
L-Carnosina	60,0 mg
CoEnzima Q10	25,0 mg
T-Resveratrol	2,5 mg
Ácido Hialurónico	40,0 mg
Aceite de onagra (<i>Oenothera biennis</i>), Aceite de Semilla de Borraja (<i>Borago Officinalis</i>) (Solvente: Glicerol, Emulsionante: Lecitina de Soja)	25,0 mg
Licopeno	0,10 mg
Extracto de pimienta negra (Bioperine®)	1,50 mg
Extracto de Baya de acai	30,0 mg
Granada	20,0 mg
Vitamina C (Ácido Ascórbico)	80,0 mg (100% NRV*)
Vitamina A (Betacaroteno)	150 μg (15% NRV*)
Vitamina D (D3)	5 μg (100% NRV*)
Vitamina E (D- α -Tocoferol)	6,0 mg (50% NRV*)
Vitamina B6 (Clorhidrato de piridoxina)	1,65 mg (118% NRV*)
Cobre	0,15 mg (15% NRV*)
Biotina (D-Biotina)	50 μg (100% NRV*)
Zinc (gluconato)	1,50 mg (15% NRV*)
N-Acetilglucosamina	5,0 mg
Ácido Cítrico	450,0 mg
Polisacárido de soja	200,0 mg
Ácido Málico	100,0 mg
Estevia	30,0 mg
Aromatizantes	0,2250 mg
Agua	23.873 g
*NRV= Valor de referencia de nutrientes	

- 10 Los suplementos nutricionales líquidos realizados como se describió anteriormente administrados a los humanos redujeron el daño oxidativo al sistema integumentario.

En particular, al contrarrestar la formación de radicales libres, la ingesta de suplemento nutricional líquido redujo la sequedad de la piel, mejoró la firmeza y elasticidad de la piel y ejerció un efecto antienvjecimiento al disminuir la profundidad y la superficie total de las arrugas.

También actuó sobre la función del folículo, reduciendo la pérdida de cabello y manteniendo las uñas sanas.

- 5 La realización del suplemento nutricional no se limita a estos ejemplos, sino que puede tener variantes que no superan los límites de las reivindicaciones suscritas.

A continuación se probaron diferentes combinaciones de los ingredientes principales contenidos en el suplemento nutricional objeto de la presente divulgación para investigar su efecto sinérgico sobre las actividades de las metaloproteinasas.

10 **Materiales y procedimientos**

Cultivo celular

- 15 Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos normales de adulto NHDF-ad (Lonza) en medios de crecimiento de fibroblastos (FGM) (Lonza) con suero bovino fetal al 2% (FBS). Se sembraron placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Se dejó que las células se unieran durante 24 horas antes de que se agregaran 250 µl de medio fresco a cada pocillo (FGM con FBS al 0,3%, 100 µM de ácido ascórbico y 100 µg/ml de sulfato de dextrano de 500 kDa, para inducir la inanición del suero y la acumulación macromolecular) con los ingredientes de prueba, en duplicado, durante 48 horas.

El control positivo considerado para este estudio fue 5 ng/ml de TGFβ1 humano recombinante (Peprotech) en medios acumulados y el control negativo fue solo en medios acumulados.

- 20 Los ingredientes probados se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5

Constituyente	Abreviatura	Concentración (mg/ml)
Colágeno hidrolizado de piscina	C	2.000
Carnosina	CS	24
CoEnzima Q10	Q10	10
Resveratrol	R	1

Las diversas combinaciones de los ingredientes probados se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 6

Número	Combinación
0	Promedio en solitario
1	C
2	C + CS
3	C + CS + Q10
4	C + CS + Q10 + R

25

Después de 48 horas de incubación con las diversas combinaciones de ingredientes, los sobrenadantes (limpios de células) se recogieron para la evaluación de la metaloproteinasas MMP-1, expresión de MMP-3.

Preparación de la muestra

- 30 Se levantaron las células de los pocillos añadiendo 168,85 µl de HBSS-Ca/Mg y 18,75 µl (10X) de tripsina-EDTA (Sigma) a cada pocillo, se incubaron a 37°C durante 20 minutos con agitación y luego se retiraron las muestras en tubos que contienen 62,5 µl de ácido oxálico 1 M, asegurando que la muestra se mezcle. Las muestras en ácido se

calentaron durante 1 hora a 95-100°C.

Mediciones ELISA

La MMP-1 total y la MMP-3 total se midieron usando procedimientos como se describe en el kit ELISA establecido relevante (R&D Systems).

5 Resultados

Se evaluó el efecto de la adición de los ingredientes del suplemento nutricional aquí divulgado en la síntesis de MMP-1 y MMP-3 por células NHDF.

10 Las células NHDF se trataron durante 48 horas en cualquiera de los medios solos (0), o con la adición de varias combinaciones de ingredientes principales (1-4, véase las **Tablas 5 y 6** en la sección de Materiales y Procedimientos para obtener más detalles).

Los ingredientes, como se describen en las **Tablas 5 y 6**, se probaron y se compararon con el efecto de los medios solos (0; 100%).

Síntesis de MMP-1, MMP-3

La síntesis de MMP-1 y MMP-3 se midió en el sobrenadante solo donde eran más abundantes.

15 MMP

MMP-1

Se observó una disminución altamente significativa en los niveles de proteína MMP-1 sobrenadante (Fig. 2) en respuesta a la adición de otros constituyentes principales del objeto de suplemento nutricional de la presente descripción (1; 65,3 ± 13,2%, 2; 83,3 ± 13,2%, 3; 64,6 ± 12,5%, 4; 47,2 ± 9% del control de medios).

20 MMP-3

De manera similar, MMP-3 disminuyó significativamente en sobrenadantes en respuesta a la adición de otros constituyentes principales del objeto de suplemento nutricional de la presente descripción (Fig. 3) (1; 76,9 ± 13,7%, 2; 76,4 ± 19%, 3; 62,1 ± 12%, 4; 47 ± 9,6% del control de medios).

25 Los resultados observados aquí demuestran la eficiencia antioxidante y antienvjecimiento del suplemento nutricional aquí descrito en la mejora del sistema integumentario.

Los ingredientes se ensayaron en fibroblastos dérmicos humanos normales.

Se evaluó la expresión de las MMP celulares para verificar si sus niveles se redujeron debido a la actividad antioxidante

de los ingredientes ensayados.

30 Los resultados han mostrado una disminución significativa en la síntesis de MMP-1 y MMP-3 en el sobrenadante con el objeto de suplemento nutricional de la presente descripción.

Estos datos sugieren un beneficio del suplemento nutricional en la restauración de la homeostasis de la matriz extracelular.

35 El efecto observado sobre las metaloproteinasas sugiere que las propiedades antioxidantes del suplemento nutricional reducen la degradación del colágeno/elastina en la piel.

Referencias

- Finkel, T. y N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature 408(6.809): 239-247.
- 40 -Ganceviciene, R., A. I. Liakou, A. Theodoridis, E. Makrantonaki and C. C. Zouboulis (2012). "Skin anti-aging strategies." Dermatoendocrinol 4(3): 308-319.
- Guo, H., Huang, K., Zhang, X., Zhang, W., Guan, L., Kuang, D., Deng, Q., Deng, H., Zhang, X., He, M., Christiani, D., Wu, T. (2014). "Women are more susceptible than men to oxidative stress and chromosome damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons exposure". Environ Mol Mutagen. [Epub ahead of print]
- 45 -Hao, L., Huang, H., Gao, J., Marshall, C., Chen, Y., Xiao, M. (2014). "The influence of gender, age and treatment time on brain oxidative stress and memory impairment induced by d-galactose in mice". Neurosci Lett 571C:45-49.
- Kohen, R. (1999). "Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress--new approaches for their evaluation." Biomed Pharmacother 53(4): 181-192.

- Kozina, L. S., I. V. Borzova, V. A. Arutiunov and G. A. Ryzhak (2012) . "The role of oxidative stress in skin aging." Adv Gerontol 25(2): 217-222.
- Kunwar, A. y K.I. Pridashini (2011) . "Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants on human health." J Med Applied Sci 1(2):3-60.
- 5 -Levine, R. L. y E. R. Stadtman (2001). "Oxidative modification of proteins during aging." Exp Gerontol 36(9): 1.495-1.502.
- Sohal, R.A. y R. Weindruch (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging". Science 273(5.271): 59-63.
- Turrens, J.F. y J.M. McCord (1990). "Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids". Paulet, A.C.; Douste-Blazy, L.; Paoletti, R., editors. Plenum; Nueva York: 203-212.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un suplemento nutricional que comprende colágeno hidrolizado, carnosina, CoEnzimA Q10 y Resveratrol.
2. Un suplemento nutricional de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho colágeno hidrolizado está presente en una cantidad entre 0,5 y 10 g/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 1,75 y 7,5 g/50 ml, más preferiblemente entre 3 y 5 g/50 ml.
3. Un suplemento nutricional de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha carnosina está presente en una cantidad entre 10 y 250 mg/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 20 y 160 mg/50 ml, más preferiblemente entre 40 y 80 mg/50 ml.
4. Un suplemento nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha CoEnzimA Q10 está presente en una cantidad entre 5 y 250 mg/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 9 y 200 mg/50 ml, más preferiblemente entre 15 y 150 mg/50 ml.
5. Un suplemento nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho Resveratrol está presente en una cantidad entre 0,2 y 450 mg/50 ml, preferiblemente en una cantidad entre 1,0 y 200 mg/50 ml, más preferiblemente entre 2,0 y 80 mg/50 ml.
6. Un suplemento nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una emulsión que comprende aceite de semilla de borraja y aceite de onagra.
7. Un suplemento nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además al menos un ingrediente seleccionado entre ácido hialurónico, licopeno y extracto de pimienta negra.
8. Un suplemento nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho suplemento comprende además al menos un ingrediente seleccionado entre baya de acai, granada, vitaminas, preferiblemente vitamina C y vitamina A.
9. Un suplemento nutricional de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho suplemento comprende además vitaminas seleccionadas entre vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₆, vitamina B₁₂, vitamina C, vitamina D, biotina.
10. Uso no terapéutico de un suplemento nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para reducir el daño oxidativo al sistema integumentario.

Preparación & pasteurización

2) Diagrama de flujo de la preparación

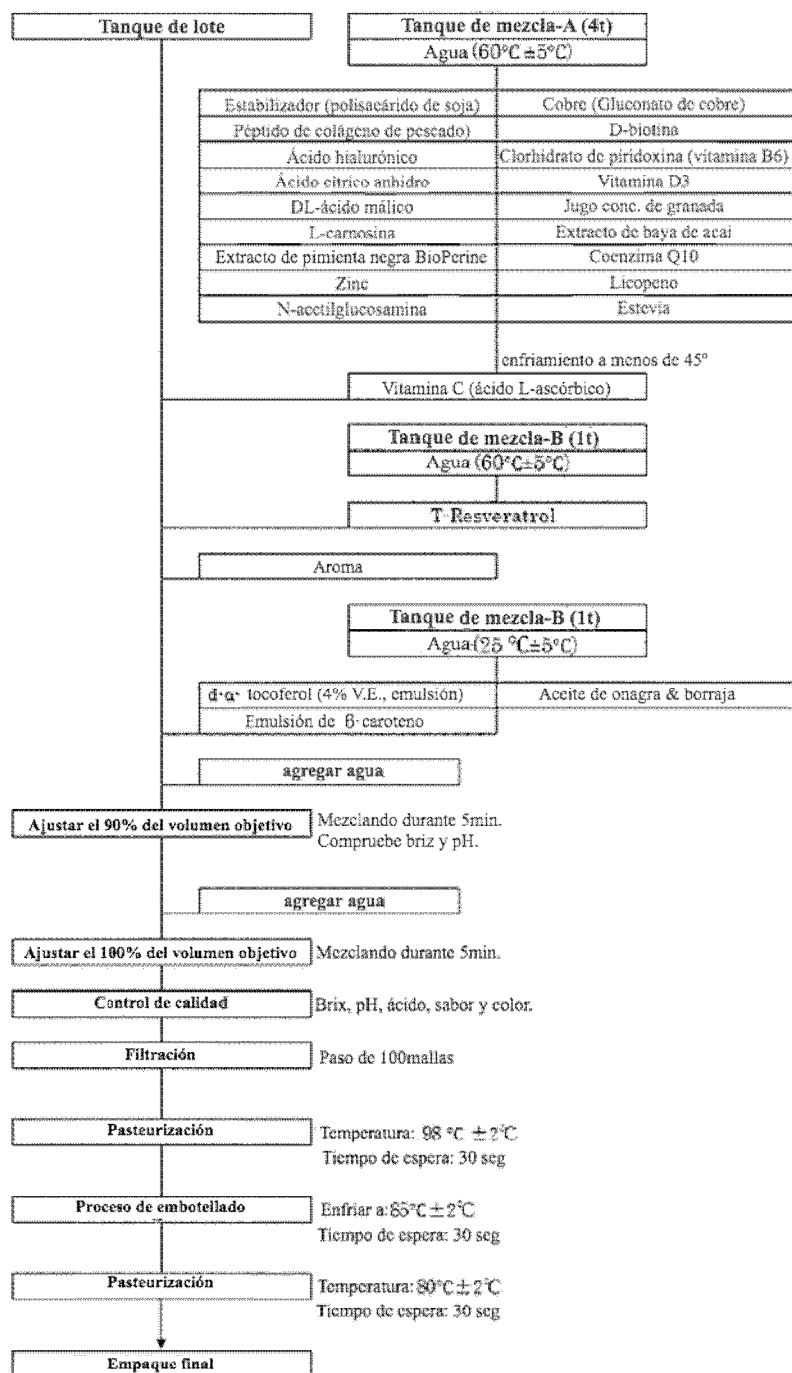


FIGURA 1

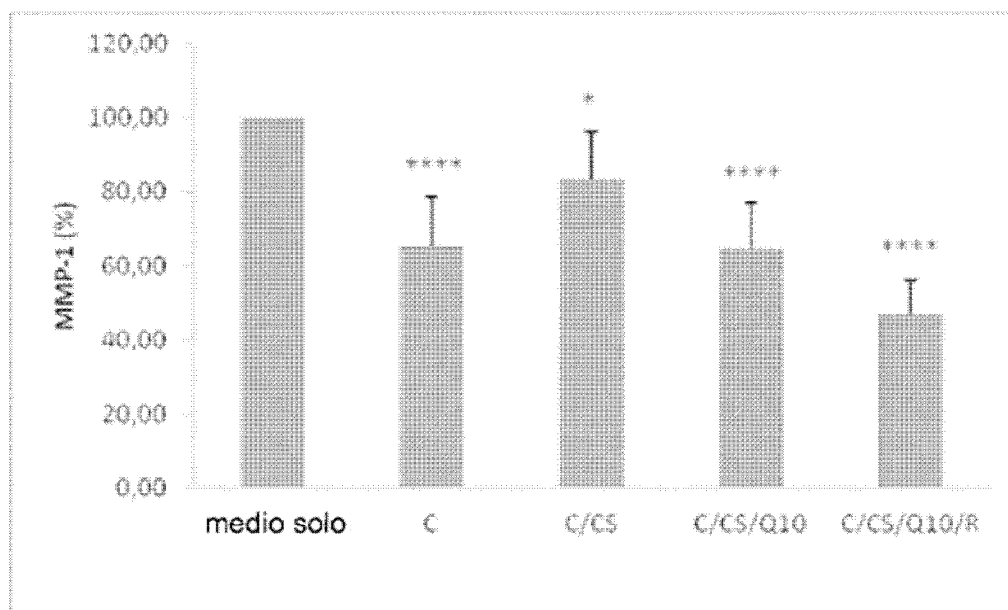


FIGURA 2

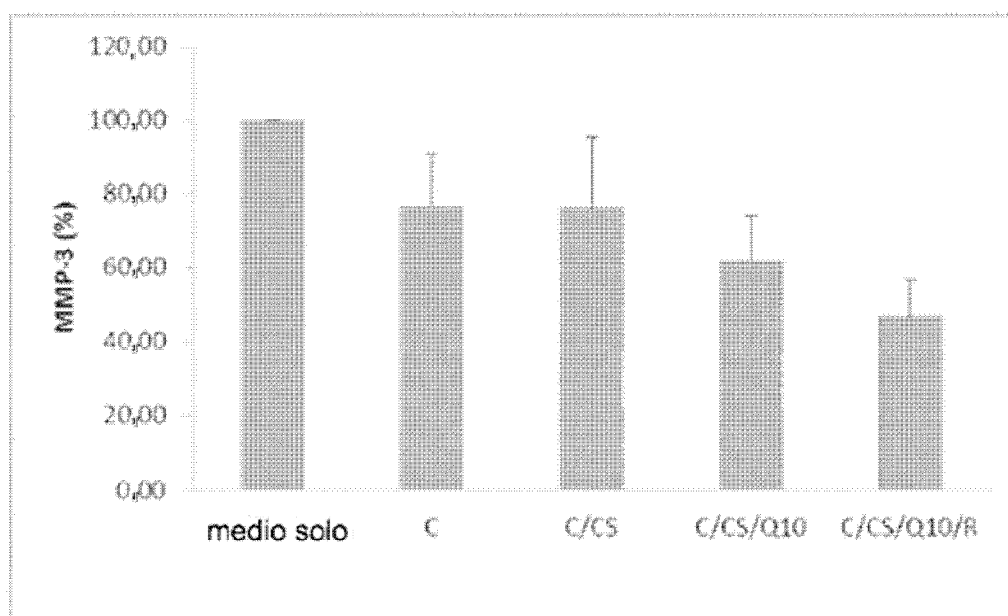


FIGURA 3