

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 436**

51 Int. Cl.:

**A61Q 17/00** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

**A61K 8/96** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/FR2016/050895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170256**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16720461 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3285888**

54 Título: **Uso cosmético de un extracto de Diospyros mespiliformis solo o en combinación con otros ingredientes activos como agente anticontaminación**

30 Prioridad:

**20.04.2015 FR 1553518**

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

**10.03.2020**

73 Titular/es:

**LABORATOIRES CLARINS (100.0%)  
12 avenue de la Porte des Ternes  
75823 Paris Cedex 17, FR**

72 Inventor/es:

**COURTIN, OLIVIER;  
FITOUSSI, RICHARD y  
WEBER, SANDRINE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 747 436 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

Uso cosmético de un extracto de *Diospyros mespiliformis* solo o en combinación con otros ingredientes activos como agente anticontaminación

- 5 La presente invención se refiere al uso cosmético de un extracto de *Diospyros mespiliformis* solo o en combinación con un extracto de Sanícula europea y/o un extracto de *Furcellaria lumbricalis* y/o un extracto de *Lampsana communis* para luchar contra los efectos y/o prevenir los efectos de la contaminación sobre la piel; la invención se refiere también a un procedimiento cosmético de prevención o de tratamiento cosmético de los efectos cutáneos de la contaminación que consiste en aplicar sobre la piel un extracto de *Diospyros mespiliformis* solo o en asociación con otros agentes activos.
- 10 El aire puro es una mezcla de 78 % de nitrógeno, 21 % de oxígeno, 0,09 % de argón, 0,1 % de vapor de agua y otros gases más o menos raros, incluidos el gas carbónico, el hidrógeno, el ozono.
- 15 La contaminación atmosférica se define por la modificación del aire puro por modificación de sus componentes o por adición de elementos nocivos. De manera muy esquemática, es posible considerar que los contaminantes actualmente registrados son producidos esencialmente por la industria, la calefacción y la circulación de automóviles. Es habitual clasificar los contaminantes en siete familias químicas:
- los agentes oxidantes tales como el ozono o los óxidos de nitrógeno son irritantes y generadores de radicales libres;
  - los polvos son partículas en suspensión que a veces fijan hidrocarburos policíclicos; su papel nocivo es modificado por la temperatura y el grado de humedad del aire, las partículas ácidas son irritantes; se observa una disminución de la hidratación y de la oxigenación de los tejidos.
  - los productos químicos orgánicos son cancerígenos, provienen de desechos de la industria y de la combustión de los automóviles;
  - el monóxido de carbono provoca una hipoxia tisular, proviene en un 80 % de los automóviles;
  - los hidrocarburos y los disolventes representan el 50 % de la contaminación del automóvil, son tóxicos, irritantes, cancerígenos y mutagénicos; en presencia de la luz, reaccionan con los óxidos de nitrógeno y producen ozono;
  - el dióxido de azufre es uno de los productos de la combustión del fueloil y del carbón, provoca una alteración de la película hidrolipídica de la piel e irritaciones cutáneas;
  - los metales tales como el plomo, zinc, aluminio, mercurio, ... pueden interferir con el metabolismo celular, por perjuicio de las reacciones enzimáticas. Ellos participan en los daños oxidativos con lesiones del ADN y de los lípidos celulares.
- 30 El aire interior de las viviendas, en continuidad con el aire exterior, comprende también estas fuentes específicas de contaminantes que pueden ser de origen biológico (fuentes de humedad y mohos, endotoxinas, alérgenos, etc.), físico (radón, partículas, fibras, etc.) y químico (humo de tabaco, aldehídos, compuestos orgánicos volátiles ... COV, metales, etc.).
- 35 En 1969, Harry Daniell reconocía que los fumadores parecen más viejos que los no fumadores. Más tarde, desarrolló un sistema de clasificación de las arrugas, lo que le ha permitido analizar la asociación entre el tabaquismo y la piel arrugada más objetivamente; con este sistema, ha podido validar su primera impresión. Posteriormente, su sistema ha sido utilizado en diversos estudios epidemiológicos (Daniell HW. Smoker's wrinkles. A study in the epidemiology of "crow's feet". Ann Intern Med 1971, 75: 873-80).
- 40 Estos estudios epidemiológicos han demostrado que el tabaquismo crónico era un importante factor ambiental implicado en el envejecimiento cutáneo precoz (Morita A. Tobacco smoke causes premature skin aging. J Dermatol Sci 2007; 48: 169-75). Los mecanismos fisiopatológicos mencionados son numerosos. La deshidratación del estrato córneo por el humo del tabaco explicaría en parte la disminución del espesor de la capa córnea (Freiman A *et al.*, Cutaneous effects of smoking. J Cutan Med Surg 2004; 8:415-23). Al liberar tiocianatos, aumentando la tasa de carboxihemoglobina y favoreciendo la secreción de vasopresina, el tabaquismo crónico es el origen de una isquemia crónica relativa de la dermis, con disminución de la presión parcial transcutánea en O<sub>2</sub>. Por esto, el metabolismo dérmico es modificado: las fibras elásticas distróficas y proteoglicanos se acumulan, las proteínas de la matriz extracelular se degradan más por las metaloproteasas y la síntesis del colágeno disminuye.
- 45 La asociación entre el tabaquismo y el envejecimiento de la piel parece estar mediada a través de una expresión más elevada de ARNm de la MMP-1 y de la MMP-3, así como de una disminución de los colágenos I y III (Yin L *et al.* Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2001; 17:178-83; Yin L *et al.* Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. Arch. Dermatol Res 2000; 292: 188-94).
- 50

El tabaquismo parece estar asociado también con un aumento de la elastosis y de las telangiectasias (Kennedy C *et al.* Effect of smoking and sun on the aging skin J Invest Dermatol 2003; 120:548-54), lo que indica otras vías moleculares además de la inducción de la expresión de MMP-1. Recientemente, se ha sugerido que la vía AhR puede desempeñar un papel en el proceso de envejecimiento prematuro de la piel inducido por el tabaco (Monta A *et al.* Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. J. Investig. Dermatol Symp Proc 2009; 14:53-5).

La piel, órgano cuya función principal es la de ser una barrera externa, está en contacto directo con los diferentes contaminantes del aire y, en consecuencia, el contacto de la piel con la contaminación del aire induce, especialmente a un envejecimiento de la piel.

Algunos estudios han investigado el efecto del ozono sobre la piel o sobre las células cutáneas. El ozono es un contaminante que se puede formar a nivel del suelo como resultado de una interacción entre la radiación solar y las emisiones de gas del tubo de escape. McCarthy *et al.* han expuesto a concentraciones de ozono medidas en las ciudades, queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) y han analizado sus efectos. Los niveles de peróxido de hidrógeno y de IL-1 $\alpha$  aumentan mientras que los niveles de ATP disminuyen. Finalmente, McCarthy *et al.* han comprobado que el ozono aumenta los daños del ADN (McCarthy JT *et al.*, Effects of ozone in normal human epidermal keratinocytes. Exp Dermatol, 2013 May; 22(5):360-1). Otros estudios han investigado el efecto del ozono sobre el tejido cutáneo murino, que demuestra que el ozono, un agente oxidante potente, puede afectar la integridad de la piel (Thiele JJ *et al.*, Ozone-exposure depletes vitamin E and induces lipid peroxidation in murine stratum corneum. J Invest Dermatol 1997; 108:753-7). Igualmente, un estudio ha demostrado que el ozono era capaz de inducir la expresión de MMP-9 en la piel murina, lo que indica un papel en la remodelación matricial (Valacchi G *et al.*, Induction of stress proteins and MMP-9 by 0.8 ppm of ozone in murine skin. Biochem Biophys Res Commun 2003; 305:741-6).

Un estudio epidemiológico reciente ha descubierto un vínculo directo entre la exposición a las partículas en suspensión (PM) y la aparición de signos de envejecimiento de la piel, tales como las manchas pigmentarias y también las arrugas (Vierkötter A *et al.* Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. J Invest Dermatol 2010; 130:2719-26). Un mecanismo importante por el cual las partículas ambientales ejercen sus efectos nocivos es la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) (Donaldson K *et al.*, Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. Part Fibre Toxicol 2005; 2:10).

Además, las partículas pueden servir de soportes para productos químicos orgánicos y metales, que son capaces de localizarse en las mitocondrias para generar allí ROS que conducen al envejecimiento de la piel por lesiones mitocondriales (Li N, Sioutas C *et al.* Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environ Health Perspect 2003; 111:455-60). Otra vía que induce el envejecimiento de la piel podría ser la de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Adsorbidos en la superficie de las partículas en suspensión en el aire de las zonas urbanas, los HAP pueden activar el metabolismo de los xenobióticos. a través de AhR (Menichini E. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. Sci Total Environ 1992; 116: 109-35).

Otros trabajos dirigidos por Ushio *et al.* (1999) han analizado la acción de las partículas diésel sobre los queratinocitos en cultivo. Altas concentraciones de partículas diésel son responsables de alteraciones en el crecimiento de estas células y de su migración.

Por lo tanto, las partículas tendrían una acción directa sobre la integridad cutánea. Además, esta exposición provoca un aumento en la secreción de IL-8. Por lo tanto esta citocina está implicada en las reacciones cutáneas inflamatorias. Este estudio parece sugerir que las partículas diésel podrían desempeñar un papel en el inicio y/o en la patogénesis de trastornos cutáneos inflamatorios tales como el eczema, la dermatitis alérgica o la psoriasis (Ushio, H., K. Nohara, *et al.* (1999), "Effect of environmental pollutants on the production of pro-inflammatory cytokines by normal human dermal keratinocytes". Toxicol Lett 105 (1): 17-24).

Por lo tanto, parece que los contaminantes atmosféricos exteriores e interiores son la causa de numerosas manifestaciones cutáneas antiestéticas: especialmente una alteración del espesor, de la elasticidad, de la firmeza o incluso de la luminosidad de la piel, una aparición de arrugas y de un tinte apagado o incluso manchas pigmentarias. Aun cuando estas manifestaciones cutáneas permanecen superficiales y no son patológicas, la mayoría de los individuos están más o menos expuestos a los contaminantes y existe una gran necesidad de poner a punto nuevas formulaciones cosméticas que permitan prevenir o frenar su aparición.

Se recuerda que la piel es un órgano muy extenso que recubre toda la superficie del cuerpo y totaliza en el hombre adulto una superficie de aproximadamente 1,6 metros cuadrados. Tiene por función proteger los tejidos profundos del medio exterior y tiene una actividad especialmente a nivel de la inmunidad, de la regulación de la temperatura y de la pérdida de fluidos. La piel está constituida por tres partes principales. Una parte delgada superficial denominada epidermis, una parte interna y gruesa denominada dermis, y una parte profunda y grasienta denominada hipodermis. La epidermis se caracteriza esencialmente por su organización en estratos correspondiente a un estado de diferenciación creciente de los queratinocitos, células que constituyen aproximadamente el 90 % de

- la epidermis. Estos queratinocitos migran desde las capas profundas de la epidermis hacia la superficie externa de la epidermis. Durante esta migración, los queratinocitos sufren numerosas modificaciones bioquímicas y estructurales, de las cuales la más importante es la queratinización, un proceso por el cual las células sintetizan la queratina. La capa córnea, la capa más superficial de la epidermis está compuesta principalmente por células muertas denominadas corneocitos, es en particular muy resistente a las agresiones externas. La epidermis puede ser definida como un epitelio de revestimiento que constituye la estructura externa de la piel. Ella asegura la protección de la piel, especialmente por la producción de queratina, una proteína filamentosa y resistente. La queratina es en parte responsable de la impermeabilidad de la piel.
- La dermis está separada de la epidermis por la "unión dermoepidérmica". Continúa en profundidad sin límite franco por la hipodermis. El papel de la dermis es especialmente mantener la flexibilidad y la resistencia de la piel. Asegura también otras funciones esenciales. Su vascularización importante le permite realizar intercambios nutritivos con la epidermis. También le permite ser rica en células inmunitarias de tipo macrófagos y células dendríticas, actores esenciales de la defensa inmunitaria de la piel. Además, es un tejido inervado que posee receptores sensibles responsables del sentido del tacto. Finalmente, interviene en los fenómenos de cicatrización y de regulación de la proliferación y de la diferenciación de los queratinocitos mediante la síntesis de las citocinas y de los factores de crecimiento solubles con destino a la epidermis. La dermis es un tejido conjuntivo de sostén esencialmente constituido por fibroblastos y por una red microfibrilar de colágeno, de elastina y de proteoglicanos que forman la matriz extracelular. La matriz extracelular es el sustrato de adhesión de los fibroblastos y el soporte mecánico del tejido.
- En el marco de las investigaciones dirigidas a identificar agentes activos destinados a proteger y/o a reparar los efectos cutáneos de la contaminación atmosférica exterior y/o interior, el solicitante ha descubierto que los extractos de *Diospyros mespiliformis* presentan una marcada actividad contra los efectos cutáneos del formaldehído, del humo de los cigarrillos y de las partículas finas (véanse los ensayos descritos en el ejemplo 1).
- La presente invención se refiere así al uso cosmético de un extracto de *Diospyros mespiliformis* o a una composición cosmética que lo comprende para prevenir y/o reparar los efectos cutáneos de la contaminación; el uso según la invención es particularmente adecuado para una aplicación a las pieles sanas.
- En el marco de la presente invención, se denomina piel sana una piel que no presenta ninguna patología cutánea y que además está en buen estado (en el sentido del Artículo 2.1 (a) del Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos).
- Diospyros mespiliformis*, también denominado ébano de África es una planta de la familia Ebenaceae, se trata de un árbol originario de África de hoja perenne que puede alcanzar 40 cm de altura con una corona muy ramificada y un follaje denso. Las hojas son alternas, simples y enteras y las flores son de color blanco a amarillo verdoso. Su fruto se consume tradicionalmente como bebida o como papilla mezclada con harina de maíz.
- Esta planta se utiliza para la preparación de medicinas tradicionales, especialmente debido a sus propiedades antibióticas; también se utiliza para mejorar la fertilidad, tratar el paludismo, la sífilis, la lepra, las micosis o incluso como antiparasitario. Las infusiones de hojas se utilizan para tratar la fiebre, las otitis y las heridas,
- Hasta la fecha, no se ha descrito ninguna actividad de esta planta para prevenir o reparar los efectos cutáneos de la contaminación.
- Los ensayos realizados por el solicitante, sobre modelos de epidermis sana, tratados o no por un extracto de *Diospyros mespiliformis* y expuestos a diversos contaminantes, han permitido poner en evidencia las siguientes actividades del extracto de *Diospyros mespiliformis*:
- Este extracto previene y corrige los efectos cutáneos nocivos del formaldehído reforzando la barrera cutánea por inducción de la expresión de los marcadores constitutivos de la envoltura córnea (hornerina HRNR, pequeña proteína rica en prolina SPRR2A, CE2B, LCE3D); este efecto se confirma también mediante la identificación, por inmunohistoquímica, de la inducción de la expresión de la loricrina, proteína mayoritaria de la envoltura córnea. Además, este extracto induce también el aumento de la expresión de SIRT1, proteína implicada en la homeostasis de los procesos de proliferación y de diferenciación de los queratinocitos. Finalmente, el extracto de *Diospyros mespiliformis* protege la epidermis sometida al formaldehído reduciendo las manifestaciones inflamatorias; en efecto, los resultados obtenidos demuestran que los marcadores de la inflamación, de la apoptosis y de la degradación matricial están sub-expresados; las valoraciones de la citocinas IL-8 y de las proteasas matriciales MMP1, MMP9 confirman los resultados del estudio transcriptómico.
  - El extracto de *Diospyros mespiliformis* protege la epidermis expuesta al humo de los cigarrillos no precisando más de los actores de la inflamación. Los resultados de los ensayos presentados en el ejemplo 1 muestran que los marcadores de la inflamación, de la apoptosis y de la degradación matricial están sub-expresados en presencia del extracto; las valoraciones de las citocinas IL1- $\alpha$ , IL-8 y MMP1 confirman los resultados del estudio transcriptómico. Además, el extracto de *Diospyros mespiliformis* permite asegurar el mantenimiento de una buena hidratación (FLG2, CD44). Los resultados obtenidos muestran también que el uso de este extracto en la epidermis permite preservar y

restaurar la cohesión celular y la comunicación celular aseguradas especialmente por la claudina 1 (CLDN1) y la desmocolina 1 (DSC1), así como la unión dermo-epidérmica de los efectos del humo de cigarrillos (mantenimiento o restauración de la expresión de los genes de los colágenos IV y VII). Estos ensayos muestran especialmente que el extracto de *Diospyros mespiliformis* contribuye al mantenimiento de la homeostasis de la piel cuando está expuesta a contaminantes.

- Finalmente, el extracto de *Diospyros mespiliformis* previene y repara la alteración de la función barrera por las partículas atmosféricas; esto resulta del fuerte aumento de la expresión de la loricrina, que juega un papel clave en la función barrera cutánea. Los ensayos realizados por comparación de una epidermis sana alterada por la presencia de partículas y de una epidermis tratada con un extracto de *Diospyros mespiliformis* antes de ser expuesta a las partículas, demuestran que esta última conserva una buena cohesión celular y una buena comunicación celular aseguradas especialmente por la claudina 1 (CLDN1) y la desmocolina 1 (DSC1) y se ve su unión dermo-epidérmica protegida de los efectos de las partículas (aumento de la expresión de los genes de los componentes mayoritarios de la unión dermo-epidérmica, colágenos IV, VII y nidógeno I).

El extracto de *Diospyros mespiliformis* utilizable según la invención puede provenir de cualquier parte de la planta; preferiblemente, de las partes aéreas de la planta y aún más preferiblemente de las hojas. La extracción del extracto a partir de la planta o de las partes elegidas se puede realizar mediante molienda y extracción con disolventes acuosos y/u orgánicos, preferiblemente acuosos.

Según un modo de realización particular de la invención, el extracto de *Diospyros mespiliformis* utilizado según la invención es un extracto acuoso de hojas estabilizado con maltodextrina obtenido por las siguientes etapas:

- molienda de hojas de *Diospyros mespiliformis*;

- extracción con agua;

- separación;

- purificación;

- adición de maltodextrina;

- filtración;

- secado por atomización.

El extracto así obtenido es un polvo de color amarillo-anaranjado a beige con un olor característico; preparado en solución acuosa al 1 % y su pH está comprendido entre 5,0 y 7,0.

Preferiblemente, el extracto de *Diospyros mespiliformis* se formula en una composición cosmética en la cual el experto en la materia podrá adaptar la composición a las propiedades fisicoquímicas del extracto.

Preferiblemente, dicha composición cosmética comprende de 0,01 a 10 %. preferiblemente de 0,01 a 2 % de extracto de *Diospyros mespiliformis* en peso de materia seca con respecto al peso total de la composición.

De manera convencional, esta composición también puede comprender uno o varios agentes de formulación o aditivos de uso conocido y utilizados en composiciones cosméticas y dermatológicas tales como, a modo de ejemplos y de manera no limitativa, suavizantes, colorantes, agentes activos filmógenos, tensioactivos, perfumes, conservantes, emulsionantes, aceites, glicoles, vitaminas como la vitamina E, filtros UV, etc. Gracias a estos conocimientos en materia de cosmética, los expertos en la técnica sabrán qué agentes de formulación añadir a las composiciones de la invención y en qué cantidades en función de las propiedades deseadas.

Esta composición se puede presentar de cualquier forma conocida por los expertos en el campo de la cosmetología y de la dermatología sin otra restricción galénica que la aplicación sobre la cara y sobre el cuerpo. De forma ventajosa, se presenta en forma de gel, loción, crema, emulsión, leche, spray, etc.

La presente invención se refiere así al uso cosmético de un extracto de *Diospyros mespiliformis* o de una composición que lo comprende para proteger la piel contra los daños cutáneos, es decir, las manifestaciones indeseables visibles sobre la piel, inducidas por la contaminación atmosférica y/o reparar estas manifestaciones o trastornos cutáneos inducidos por la contaminación atmosférica; la utilización según la invención es ventajosa, tanto si la contaminación atmosférica resulta de la presencia de contaminantes interiores como exteriores, se puede tratar en particular de una contaminación resultante de la presencia en el aire ambiental de agentes oxidantes tales como el ozono o los óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono, hidrocarburos y disolventes, dióxido de azufre, metales, formaldehído, humo de cigarrillos, partículas o polvo fino en suspensión, o incluso ondas electromagnéticas.

Más particularmente, la utilización de un extracto de *Diospyros mespiliformis* o de una composición que lo contiene, permite prevenir la aparición de manifestaciones cutáneas visibles sobre la piel, signos de su degradación y/o reparar los trastornos cutáneos inducidos por la contaminación mediante las siguientes actividades:

- aumento de la cohesión cutánea y del estrato córneo y mejora de la función barrera de la piel;
- 5 - restauración de la homeostasis de los procesos de proliferación y de diferenciación de los queratinocitos.
- restauración de la matriz dérmica;
- restauración de la hidratación cutánea;
- mejora de la cohesión de las células cutáneas;
- mejora de la comunicación celular;
- 10 - restauración de la unión dermo-epidérmica.

15 Sobre la base de estas propiedades, la utilización del extracto de *Diospyros mespiliformis* o de una composición que lo contiene es particularmente útil para prevenir y/o limitar y/o corregir el envejecimiento de la piel inducido por la contaminación y las diferentes manifestaciones cutáneas asociadas con el mismo, en particular, prevenir y/o corregir las arrugas y líneas finas y/o conservar la luminosidad y/o aumentar la hidratación y/o regular la descamación y/o mantener o estimular la flexibilidad de la piel sometida a contaminación.

Con el fin de ampliar el espectro de acción del extracto de *Diospyros mespiliformis* o de la composición que lo contiene, puede ser ventajoso asociarle con otros agentes cosméticos activos que refuerzan sus efectos cosméticos y/o que presentan uno o varios efectos cosméticos distintos complementarios.

20 Por lo tanto, es ventajoso asociar el extracto de *Diospyros mespiliformis*, eventualmente en una composición cosmética, con uno o varios de otros agentes cosméticos antioxidantes y/o anticontaminación.

Preferiblemente, estos agentes cosméticos se seleccionan entre:

- un extracto de Sanícula europea que presenta propiedades antioxidantes (véase el ejemplo 2) y que tiene además la propiedad de reforzar el estrato córneo y por consiguiente la función barrera de la piel (FR 3 007 980); tal extracto está presente en el producto *Anti-pollution Day Screen Multi-Protection SPF50* de la compañía CLARINS. Este extracto permite así reforzar a la vez la acción preventiva contra la contaminación y también la reparación de la piel por el extracto de *Diospyros mespiliformis*.
- 25

La Sanícula europea (*Sanicula europaea*) es una planta herbácea de la familia de las Apiáceas (Umbelíferas) que generalmente crece en la maleza.

30 Es una planta vivaz, glabra de talla mediana (15-50 cm) que se reconoce fácilmente por el aspecto globuloso de sus umbelas (3 a 5 radios desiguales).

Es conocida por ser rica en saponinas, taninos y mucílagos; se utiliza en la medicina tradicional por sus propiedades cicatrizantes, astringentes y vulnerarias.

35 El extracto de Sanícula es preferiblemente un extracto hidrosoluble de las partes aéreas (hojas, flores y tallos). De forma ventajosa, este extracto es un extracto hidroalcohólico de las partes aéreas y, preferiblemente, se estabiliza con glicerol.

Preferiblemente se trata de un extracto hidroalcohólico obtenido según un procedimiento que comprende al menos las siguientes etapas:

- secado de las partes aéreas;
- molienda;
- 40 - extracción en etanol/agua (80:20);
- filtración;
- concentración al vacío por evaporación de los disolventes de extracción;
- ajuste de la concentración (adición de glicerol).

45 El extracto de *Sanicula europaea* es un líquido amarillo-marrón ligeramente viscoso con un olor característico. Presenta las siguientes características analíticas: pH = 3,5 - 5,0; densidad relativa: 1,050-1,200; índice de refracción: 1,370-1,400; relación de planta seca/extracto = 1/10.

Preferiblemente, la composición cosmética utilizada según la invención comprende de 0,01 a 10 % de extracto de *Sanicula europaea* en peso de materia seca con respecto al peso total de la composición.

5 - un extracto de *Furcellaria lumbricalis* que es un alga roja del mar Báltico. Preferiblemente, el extracto comprende oligofurcellarano enriquecido en sales marinas. El oligofurcellarano se obtiene por la despolimerización de un furcellarano sulfatado (galactosa y anhidrogactosa) extraído del alga: al final de la despolimerización, el oligofurcellarano se rehidrata con una solución enriquecida en sales marinas, tal tipo de extracto es vendido por la empresa Codif bajo la denominación Hydranov P. Un extracto de *Furcellaria lumbricalis* se utiliza para suavizar la piel e hidratar las pieles secas en el producto Intense Hydration Youth Preserve Light Day Cream SPF15 de la empresa ORIFLAME.

10 Este extracto de *Furcellaria lumbricalis* tiene propiedades hidratantes de la piel y permite prevenir o corregir la deshidratación de la piel debida a la contaminación (véase el ejemplo 3).

Preferiblemente, dicha composición cosmética comprende de 0,01 a 10 %, preferiblemente de 0,1 a 2 %, de extracto de *Furcellaria lumbricalis* en peso de materia seca con respecto al peso total de la composición.

15 - un extracto de *Lampsana communis*; la *Lampsana communis*, de la familia de las Asteráceas, es una planta anual muy extendida, que crece al borde de las carreteras y otros sitios sometidos a la contaminación atmosférica. Es una planta no exigente y muy resistente. El documento US2009/0035235 describe su utilización en asociación con un extracto de *Camellia sinensis* para la formulación de un complejo anticontaminación que tiene propiedades antioxidantes y un efecto sobre el metabolismo energético.

20 El extracto de *Lampsana communis* utilizado en la composición según la invención se obtiene por extracción hidroglicólica de la parte aérea de la planta. De esta forma se obtiene un líquido límpido de color pardo con olor característico que presenta las siguientes características analíticas:

- contenido en agua: 18 a 26 %

- pH: 6 a 8

- densidad: 1,055 a 1,075

25 - índice de refracción: 1,420 a 1,440

Cuando se utiliza este extracto, se añade a una concentración del orden de 0,01 a 5 % en peso, preferiblemente 0,01 a 0,5 % en peso y lo más preferiblemente 0,01 a 0,05 % en peso.

La presente invención se refiere también al uso de una de las siguientes combinaciones o a una composición que la contenga:

30 - un extracto de *Diospyros mespiliformis* y un extracto de *Sanicula europea*;

- un extracto de *Diospyros mespiliformis* y un extracto de *Furcellaria lumbricalis*;

- un extracto de *Diospyros mespiliformis* y un extracto de *Lampsana communis*;

- un extracto de *Diospyros mespiliformis*, un extracto de *Sanicula europea* y un extracto de *Furcellaria lumbricalis*;

- un extracto de *Diospyros mespiliformis*, un extracto de *Sanicula europea* y un extracto de *Lampsana communis*;

35 - un extracto de *Diospyros mespiliformis*, un extracto de *Furcellaria lumbricalis* y un extracto de *Lampsana communis*;

- un extracto de *Diospyros mespiliformis*, un extracto de *Sanicula europea*, un extracto de *Furcellaria lumbricalis* y un extracto de *Lampsana communis*;

40 para luchar contra y/o prevenir los efectos de la contaminación sobre la piel, en particular, para proteger la piel contra los efectos cutáneos nocivos de la contaminación atmosférica y/o para reparar los trastornos cutáneos, es decir, las manifestaciones indeseables visibles sobre la piel, inducidas por la contaminación atmosférica; la utilización según la invención, es ventajosa tanto si la contaminación atmosférica resulta de la presencia de contaminantes interiores como exteriores, se puede tratar en particular de una contaminación resultante de la presencia en el aire ambiental de agentes oxidantes tales como el ozono o los óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono, hidrocarburos y disolventes, dióxido de azufre, metales, formaldehído, humo de cigarrillos, partículas o polvo fino en suspensión, ondas electromagnéticas.

45 Más particularmente, el uso de una de las combinaciones según la invención o de una composición que la contiene permite prevenir la aparición de manifestaciones cutáneas visibles sobre la piel, signos de su degradación y/o

reparar estas manifestaciones o trastornos cutáneos inducidos por la contaminación mediante las siguientes actividades:

- aumento de la cohesión cutánea y del estrato córneo y mejora de la función barrera de la piel;
  - restauración de la homeostasis de los procesos de proliferación y de diferenciación de los queratinocitos;
- 5
- restauración de la matriz dérmica;
  - restauración de la hidratación cutánea;
  - mejora de la cohesión de las células cutáneas;
  - mejora de la comunicación celular;
  - restauración de la unión dermo-epidérmica.
- 10
- Sobre la base de estas propiedades, el uso de una de las combinaciones según la invención o de una composición que la contiene es particularmente útil para prevenir y/o limitar y/o corregir el envejecimiento de la piel inducido por la contaminación y las manifestaciones cutáneas asociadas con dicho envejecimiento, en particular, prevenir y/o corregir las arrugas y líneas finas y/o conservar la luminosidad y/o aumentar la hidratación y/o regular la descamación y/o mantener o estimular la flexibilidad de la piel sometida a la contaminación.
- 15
- La presente invención se refiere finalmente a un procedimiento de cuidado cosmético, para prevenir y/o reparar los efectos de la contaminación sobre la piel, caracterizado por que se aplica sobre la piel una cantidad adecuada de un extracto de *Diospyros mespiliformis* solo o en combinación con un extracto de Sanícula europea y/o un extracto de *Furcellaria lumbricalis* y/o un extracto de *Lampsana communis* o de una composición que comprende dicho extracto o una de las combinaciones mencionadas.
- 20
- Figuras**
- La Figura 1 representa el módulo de exposición Vitrocell® utilizado en el modelo de formaldehído.
- Los resultados de los estudios proteómicos realizados sobre un modelo de epidermis tratado con un extracto de *Diospyros mespiliformis* expuesto al formaldehído se presentan en las Figuras 2A y 2B. .
- 25
- Los resultados de los estudios proteómicos realizados sobre un modelo de epidermis tratado con un extracto de *Diospyros mespiliformis* expuesto al humo de tabaco se presentan en las Figuras 3A y 3B.
- Los resultados de los estudios proteómicos realizados sobre un modelo de epidermis tratado con un extracto de *Diospyros mespiliformis* expuesto a partículas finas se presentan en las Figuras 4A y 4B.
- 30
- La Figura 5 es un histograma que representa el efecto sobre la tasa de ROS mitocondriales de queratinocitos expuestos a diferentes condiciones (control de células no tratadas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resveratrol y extracto de Sanícula a diferentes concentraciones).
- La Figura 6 es un histograma que representa el efecto sobre la tasa de ROS celulares de queratinocitos expuestos a diferentes condiciones (control de células no tratadas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resveratrol y extracto de Sanícula a diferentes concentraciones).
- 35
- La Figura 7 es un histograma que representa el efecto sobre la actividad de la SOD mitocondrial de queratinocitos expuestos a diferentes condiciones (control de células no tratadas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resveratrol y extracto de Sanícula a diferentes concentraciones).
- La Figura 8 es un histograma que representa el efecto sobre la actividad de la SOD mitocondrial de queratinocitos expuestos a diferentes condiciones (control de células no tratadas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resveratrol y extracto de Sanícula a diferentes concentraciones).
- 40
- La Figura 9 es un histograma que representa el efecto sobre el nivel de glutatión total de queratinocitos expuestos a diferentes condiciones (control de células no tratadas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resveratrol y extracto de Sanícula a diferentes concentraciones).
- La Figura 10 es un histograma que representa la tasa de hidratación cutánea de explantes de piel expuesta a la contaminación por gases de escape y tratada o no con un extracto de *Furcellaria lumbricalis*.
- 45
- Ejemplo 1

La demostración de la actividad anticontaminación del extracto de *Diospyros mespiliformis* ha sido realizada por la puesta a punto de nuevos modelos capaces de caracterizar los efectos de diversos contaminantes del aire interior y exterior durante la exposición única o repetida sobre la respuesta biológica de epitelios reconstituidos *in vitro*.

5 Brevemente, el modelo de estudio elegido es la epidermis reconstruida RHE (SkinEthic Lyon, Francia). Se trata de una epidermis reconstituida a partir de células primarias humanas. Se cultivan los queratinocitos en interfaz aire/líquido, en un medio definido sin suero sobre insertos que tienen una membrana de policarbonato (Insert Nunc 0,5 cm<sup>2</sup>).

10 El establecimiento de un modelo de exposición en interfaz aire-líquido de epidermis reconstruidas permite estudiar las interacciones entre las células epiteliales cutáneas, en un entorno cercano a *in vivo*, y los contaminantes ambientales.

Se han aplicado tres tipos de contaminantes a la superficie de la epidermis: el formaldehído, el humo de tabaco y las partículas.

#### Modelo de formaldehído

15 El formaldehído, mejor conocido bajo el nombre de formol cuando se disuelve en agua, es un compuesto orgánico muy volátil (COV) perteneciente a la familia de los aldehídos. De bajo peso molecular, esta sustancia tiene la propiedad de volverse gaseosa a temperatura ambiente y se encuentra actualmente con frecuencia en ambientes interiores.

20 El formaldehído tiene numerosas fuentes entre las cuales se encuentran: las fuentes de combustión, incluyendo el humo de tabaco, las velas, las varitas de incienso, las chimeneas abiertas así como las cocinas de gas, las estufas de petróleo, los productos de construcción y de decoración que contienen componentes a base de formaldehído.

Para el estudio, el modelo de epidermis reconstruido fue expuesto a una dosis de formaldehído de 2100 ppm.

Las exposiciones se realizan en un módulo de exposición Vitrocell© de seis pocillos adaptado a las muestras. Este módulo se compone de dos partes que aseguran una interfaz aire/líquido con un contacto (i) de la parte basal de las epidermis con el medio nutritivo y (ii) de la parte apical con la atmósfera generada (aire o contaminantes) (Figura 1):

25 - la parte A que acoge los insertos (las epidermis). El medio de cultivo de mantenimiento (MM) se deposita en la parte inferior del módulo con termostato (37 °C) gracias a una circulación de agua.

- el contacto directo entre atmósfera gaseosa y superficie tisular está asegurado por la parte B del módulo de exposición y las trompetas de admisión del contaminante.

30 Se han definido diferentes parámetros, tales como la velocidad del flujo de aire, el tiempo de exposición de las muestras y la frecuencia de las exposiciones, con una atmósfera de "control", como el aire. El objetivo de esta etapa ha sido definir las mejores condiciones que permitan las exposiciones en la interfaz aire/líquido sin que haya sufrimiento tisular.

#### Modelo de humo de tabaco

35 El humo de tabaco es una mezcla que contiene aldehídos, entre ellos el formaldehído y el acetaldehído, y un gran número de compuestos orgánicos volátiles, ha sido generado a partir de un cigarrillo comercial. Se tomaron 10 x 20 ml con una jeringa y se introdujeron en una cámara de exposición. Las epidermis se expusieron a 200 ml de humo de tabaco durante 60 minutos a 37 °C. Se estudió un "control-aire" en paralelo.

#### Modelo de partículas finas

40 Las partículas finas provienen del tráfico rodado, más particularmente de los motores diésel de los vehículos, pero también de la industria, de la agricultura y de la combustión (chimeneas, calefacción individual ...). Las micropartículas, del tamaño del micrómetro, no son visibles a simple vista. Son aquellas que se miden en el aire a través de las partículas PM10 (tamaño inferior a 10 µm, 6 a 8 veces más pequeñas que el tamaño de una célula) y las partículas finas o PM2,5 (tamaño inferior a 2,5 µm, como las bacterias).

45 Para el estudio, las partículas (composición: tabla a continuación) se aplicaron por vía tópica a la superficie del tejido reconstruido. Las epidermis han sido expuestas a las partículas durante 60 minutos a 37 °C. Se ha estudiado un "control-aire" en paralelo.

Compuestos orgánicos en las dos muestras PM de contaminación del aire

		Concentración (ng/m <sup>3</sup> )	
VOCs		PM <sub>2,5</sub>	PM <sub>&gt;2,5</sub>
Benceno		0,46	0,05
Tolueno		1,81	0,07
Etilbenceno		0,83	0,10
o-xileno		3,47	0,07
1,2,3-Trimetilbenceno		1,17	0,71
Trimetilbenceno		0,52	<LQ
Tetrametilbenceno		0,35	0,20
Pentametilbenceno		0,29	<LQ
<b>Total</b>		<b>8,90</b>	<b>1,2</b>
<b>PAHs</b>			
Naftaleno	Nap	0,01	0,01
Acenaftileno	Ace	<LQ	0,004
Fenantreno	Phe	0,02	0,01
Fluorantreno	Flu	0,11	0,03
Pireno	Pyr	0,28	0,06
Benzo[a]antraceno	BaA	0,19	<LQ
Criseno	Chr	0,26	0,01
Benzo[b]fluoranteno	BbF	<LQ	0,02
Benzo[k]fluoranteno	BkF	0,30	<LQ
Benzo[a]pireno	BaP	0,24	0,01
Dibenzo[a,b]antraceno	DahA	0,21	<LQ
Indeno[1.2.3-c.d]pireno	Ind	<LQ	0,07
Benzo[g,h,i]perileno	BghiP	0,37	<LQ
<b>Total</b>		<b>1,99</b>	<b>0,22</b>

<LQ = por debajo del límite de cuantificación; VOCs = compuestos orgánicos volátiles, PAHs = hidrocarburos aromáticos policíclicos

Diversos métodos de investigación han permitido caracterizar el impacto de estos contaminantes sobre el modelo de epidermis reconstruida Skinethic®:

- 5 - método transcriptómico realizado por PCR cuantitativa (126 genes "epidérmicos");
- método proteómico realizado por inmunohistoquímica;
- método de dosificación de los medios de cultivo por la técnica Elisa y la técnica multiplex.

10 En el marco de la evaluación del efecto protector del extracto de *Diospyros mespiliformis* frente a las modificaciones funcionales y estructurales de la epidermis inducidas por los contaminantes (formaldehído, humo de cigarrillo, partículas), se realizaron los siguientes ensayos:

La epidermis reconstruida Skinethic® se trata con cada uno de los contaminantes asociado o no con un extracto de *Diospyros mespiliformis* aplicado a la superficie del tejido.

El extracto de *Diospyros mespiliformis* ensayado es un extracto acuoso de hojas estabilizado con la maltodextrina obtenido por las siguientes etapas:

- 5 - molienda de hojas de *Diospyros mespiliformis*;
- extracción con agua;
- separación;
- purificación;
- adición de maltodextrina;
- 10 - filtración;
- secado por atomización.

Caracterización: polvo de color amarillo-anaranjado a beige con un olor característico; preparado en solución acuosa al 1 %, su pH está comprendido entre 5,0 y 7,0.

- 15 Al final de los tratamientos, cada epidermis se conserva para realizar análisis de la expresión de los genes por RTqPCR e inmunomarcajes de las dianas epidérmicas. Los medios de cultivo se utilizan para las valoraciones por Elisa y por Multiplex.



Estudio transcriptómico:

- 20 El estudio transcriptómico se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR) sobre las epidermis reconstruidas Skinethic®, que permite estudiar la expresión de numerosos genes. Los ARN se extraen utilizando tampón RLT y después un kit de extracción RNeasy microkit de Qiagen; a continuación son valorados y después son retro-transcritos. La qPCR se realiza entonces sobre placas de 128 genes de las funciones epidérmicas (Roche Diagnostics).

- 25 El análisis de los resultados se hace por cálculo de la diferencia de expresión entre dos condiciones, el llamado *Fold Change* (FC). Se considera que un aumento en la expresión con respecto al control se traduce por un  $FC \geq 1,5$ ; y una disminución en la expresión con respecto al control se traduce por un  $FC \leq 0,7$ .

Estudio proteómico:

El estudio proteómico se realiza por inmunohistoquímica, que permite estudiar la presencia de numerosas proteínas.

- 30 Las epidermis reconstruidas se fijan en formalina al 10 % durante 72 h, después se deshidratan y se incluyen en bloques de parafina, antes de ser cortadas en secciones de 5  $\mu\text{m}$ . Los cortes se desparafinan y después se desenmascaran (Abcam) antes de ser tratados con 0,1 % de triton X-100 (Sigma) y albúmina de suero bovino al 2 % (BSA - Sigma) durante 10 minutos, a fin de permeabilizar la membrana y saturar los sitios de fijación.

Los cortes se incuban después durante 1 h con los anticuerpos primarios dirigidos contra la loricrina y el 4-HNE (4-hidroxinonenal).

- 35 Las fotografías se toman con ayuda de un microscopio de conversión de fluorescencia (Nikon Eclipse 50i).

Valoración por Elisa, por multiplexación (Tecnología luminex):

- 40 El ensayo ELISA (acrónimo de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) es un ensayo inmunológico destinado a detectar y/o valorar una proteína en un líquido biológico. En la técnica de valoración denominada "en sandwich", los pocillos de una microplaca son tapizados con un anticuerpo de captura capaz de unirse específicamente al antígeno buscado. Durante esta operación denominada *coating*, el anticuerpo de captura se fija al plástico de los pocillos por

interacción electrostática. Se añade entonces a los pocillos un segundo anticuerpo, el anticuerpo marcador, capaz de unirse al antígeno capturado, y los anticuerpos marcadores no fijados se eliminan mediante enjuague. El anticuerpo marcador está acoplado a una enzima que cataliza la formación de un producto coloreado. La reacción puede así ser cuantificada por colorimetría a partir de una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas de antígeno, ya que el número de moléculas de anticuerpo marcador fijadas depende del número de moléculas de antígeno inmovilizadas por el anticuerpo de captura. Este ensayo se utiliza para detectar la presencia de IL-1 $\alpha$  y de IL-8.

La tecnología Luminex, basada en el principio de un ELISA combinado con citometría de flujo, permite la determinación simultánea de numerosas dianas proteicas o nucleicas en pequeños volúmenes de muestras. La tecnología implica la utilización de microesferas que son o bien cuentas de poliestireno o bien cuentas magnéticas coloreadas por una mezcla de dos fluorocromos cuya relación es conocida y perfectamente definida para cada tipo de cuentas.

Una vez que las moléculas de interés han sido fijadas a la superficie de las cuentas, estas últimas se incuban con las muestras a analizar. Después de haber seguido un protocolo experimental de tipo ELISA, los resultados se obtienen por lectura sobre un Luminex que gracias a un módulo de pipeteo y de gestión de los fluidos, aspira las muestras que contienen las cuentas en suspensión en una vena líquida de manera que en ella estén unas a continuación de las otras (analogía con la citometría de flujo) y después se excitan por un juego de dos láseres;

- un láser rojo que permite determinar el código de color de cada cuenta,
- un láser verde que excita un fluorocromo acoplado a una molécula informadora que permite detectar y dosificar la interacción antígeno-anticuerpo.

Este ensayo se utiliza para detectar la presencia de MMP1, MMP3 y MMP9.

Resultados

Ensayos con el formaldehído

Estudio transcriptómico:

	FORMALDEHÍDO [FC]*	FORMALDEHÍDO + DIOSPYROS [FC]**
TER3	3,41	0,24
IL8	7,16	1,24
CASP14	2,56	0,46
CASP8	2,26	0,19
MMP1	1,87	0,73
MMP9	3,76	0,27
SPRR2A	0,45	0,98
HRNR	0,33	2,02
LCE2B	0,70	1,36
LCE3D	0,70	1,44
SIRT1	0,07	0,62

FC: "fold change" diferencia de expresión entre dos condiciones:  
\* formaldehído frente a control, \*\*Diospyros frente a formaldehído

25

Los resultados de los estudios proteómicos se presentan en las Figuras 2A y 2B.

El extracto de *Diospyros mespiliformis* ejerce un efecto protector de la barrera cutánea al aumentar la expresión de los marcadores constitutivos de la envoltura córnea (hornerina HRNR, pequeña proteína rica en prolina SPRR2A, LCE2B, LCE3D). Estos resultados se confirman con la identificación por inmunohistoquímica de la loricrina, proteína

mayoritaria de la envoltura córnea. Igualmente, la expresión de SIRT1 implicada en la homeostasis de los procesos de proliferación y de diferenciación de queratinocitos está sensiblemente re-aumentada.

5 El extracto de *Diospyros mespiliformis* protege la epidermis sometida al formaldehído no precisando más de los actores de la inflamación. Los resultados muestran que los marcadores de la inflamación, de la apoptosis y de la degradación matricial están subexpresados en presencia de extracto de *Diospyros mespiliformis* en las condiciones experimentales elegidas. La dosificación de la citocina IL8 y de las proteasas matriciales MMP1, MMP9 confirman los resultados del estudio transcriptómico.

Ensayos con el humo de los cigarrillos

Estudio transcriptómico:

	TABACO [FC]*	TABACO + DIOSPYROS [FC]**
TLR2	31.12	0.22
TLR4	43.41	0.04
IL8	4.89	1.64
MMP1	14.32	0.02
MMP9	2.30	0.05
FLG2	0.07	0.62
CD44	0.02	0.73
KRT1	0.03	0.52
KRT10	0.06	7.67
CLDN1	0.09	0.24
DSC1	0.01	1.46
COL4A1	0.01	1.00
COL7A1	0.03	0.5

FC: "fold change" diferencia de expresión entre dos condiciones:  
\* tabaco frente a control, \*\*Diospyros frente a tabaco

10

Los resultados de los estudios proteómicos se presentan en las Figuras 3A y 3B.

15 El extracto de *Diospyros mespiliformis* protege la epidermis sometida al humo de cigarrillos no precisando más de los actores de la inflamación. Los resultados muestran que los marcadores de la inflamación, de la apoptosis y de la degradación matricial están subexpresados en presencia del extracto en las condiciones experimentales elegidas. La valoración de las citocinas IL-1α, IL-8 y de MMP1 confirma los resultados del estudio transcriptómico.

El extracto de *Diospyros mespiliformis* permite igualmente asegurar el mantenimiento de un buen nivel de hidratación (FLG2, CD44).

20 Los resultados obtenidos por tratamiento de la epidermis con el extracto de *Diospyros mespiliformis* mantienen una buena conservación de la cohesión celular y de la comunicación celular aseguradas especialmente por la claudina 1 (CLDN1) y la desmocolina 1 (DSC1).

El extracto de *Diospyros mespiliformis* preserva la unión dermo-epidérmica de los efectos del humo del cigarrillo. La expresión de los genes de los colágenos IV y VII está asegurada.

Ensayos con las partículas.

Estudio transcriptómico:

	PARTÍCULAS [FC]*	PARTÍCULAS + DIOSPYROS [FC]**
TLR2	0,19	1,24
TLR3	0,29	1,30
TLR4	0,23	2,12
CRNN	0,45	1,39
IOR	0,79	4,98
CD44	0,30	1,08
EVPL	0,46	1,05
D3G1	0,47	0,82
DSC1	0,48	1,34
NID1	0,33	5,52
COL4A1	0,13	0,40
COL7A1	0,28	0,59

(FC: "fold change" diferencia de expresión entre dos condiciones:  
\* partículas frente a control, \*\*Diospyros frente a partículas)

Los resultados de los estudios proteómicos se presentan en las Figuras 4A y 4B.

5 El extracto de *Diospyros mespiliformis* protege la función barrera de la piel y está protegida de las partículas. Especialmente, la expresión de la lorricrina en el papel clave en la función barrera está considerablemente aumentada.

Los resultados obtenidos por el tratamiento de la epidermis con el extracto de *Diospyros mespiliformis* muestran la conservación de la cohesión celular y de la comunicación celular aseguradas especialmente por la claudina 1 (CLDN1) y la desmocolina 1 (DSC1).

10 El extracto de *Diospyros mespiliformis* tiende a proteger la unión dermo-epidérmica de los efectos de las partículas. La expresión de los genes de los componentes mayoritarios de la JDE (colágenos IV, VII y nidógeno I) está aumentada.

#### Ejemplo 2

15 El objetivo de este estudio es la caracterización de la propiedad antioxidante de un extracto de Sanícula europea mediante la evaluación de los parámetros del estado redox después de la inducción de un estrés oxidativo por el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en cultivos primarios de queratinocitos humanos normales.

El extracto ensayado es un extracto hidroalcohólico obtenido como sigue:

- secado de las partes aéreas;
- molienda;
- extracción en etanol/agua (80:20);
- 20 - filtración;
- concentración al vacío por evaporación de los disolventes de extracción;
- ajuste de la concentración (adición de glicerol).

Caracterización: líquido ligeramente viscoso amarillo-marrón con un olor característico. pH = 3,5 - 5,0; densidad relativa: 1,050-1,200; índice de refracción: 1,370-1,400; relación planta seca/extracto = 1/10.

La tecnología Mitosafe® permite explorar los efectos antioxidantes de los compuestos activos a nivel mitocondrial. Esta tecnología consiste en el estudio integrado de funciones mitocondriales en las células vivas mediante la medida multiplexada de parámetros tales como la viabilidad celular, la producción de radicales libres de oxígeno celulares y mitocondriales, la evaluación de las defensas antioxidantes. Estos ensayos en placa de 96 pocillos se realizan sobre primocultivos de células epidérmicas humanas.

5

Se han medido:

- las especies reactivas del oxígeno mitocondriales;
- la tasa de producción celular de ROS;
- la superóxidodismutasa (SOD) mitocondrial y celular;

10 - el glutatión total (forma oxidada y reducida).

En los queratinocitos la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta la producción de las ROS mitocondriales, lo que provoca una sobrerregulación de la actividad SOD mitocondrial y la acumulación intracelular de ROS. También es responsable del aumento de la tasa de glutatión total, en respuesta al aumento intracelular de las ROS. La regulación al alza de la actividad de la SOD mitocondrial y el nivel de glutatión son mecanismos compensatorios que contrarrestan el estrés oxidativo inducido por la acumulación de ROS en el espacio intracelular. La SOD celular es también un mecanismo antioxidante directo. Sin embargo, en este modelo, no es inducida por la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

15

Propiedad antioxidante a través de la producción de las ROS celulares:

La metodología Mitoread AntiOx cROS consiste en la cuantificación de la actividad antioxidante de los ingredientes para las especies reactivas de oxígeno (ROS) celulares con ayuda de un marcador fluorescente.

20 En primer lugar, las células se pre-incubaron con la sonda fluorescente a 37 °C durante 30 minutos. Después de lavado, las células se co-incubaron con el compuesto de referencia antioxidante, Trolox 10 µM o los extractos a concentraciones determinadas no citotóxicas en presencia del compuesto de referencia prooxidante, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM. La producción de ROS celulares se registró inmediatamente durante 60 minutos. La fluorescencia se registró cada cinco minutos utilizando un lector de microplacas (Varioskan-Thermo). Las células se mantuvieron a 37 °C a lo largo de la cinética. Todos los extractos fueron ensayados por cuadruplicado. Sus efectos se compararon simultáneamente con los controles negativos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y positivos (trolox).

25

Propiedad antioxidante a través de la producción de ROS mitocondriales

La metodología Mitoread AntiOx mtROS consiste en la cuantificación de la actividad antioxidante de los ingredientes para las especies reactivas de oxígeno (ROS) con ayuda de un marcador fluorescente.

30 Las células se preincubaron a 37 °C durante 60 minutos con el antioxidante de referencia, el resveratrol 1 µM o los principios activos a las concentraciones predeterminadas.

A continuación, se incubaron con la sonda fluorescente a 37 °C durante 30 minutos, reemplazando los compuestos antioxidantes. Después de lavado, las células se trataron con el compuesto prooxidante de referencia, el peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM. La producción de ROS mitocondriales se registró inmediatamente durante 60 minutos. La fluorescencia se registra cada cinco minutos utilizando un lector de microplacas (Varioskan-Thermo). Las células se mantuvieron a 37 °C a lo largo de la cinética. Todos los extractos fueron ensayados por cuadruplicado. Sus efectos se compararon simultáneamente con los controles negativos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y positivos (resveratrol).

35

Propiedad antioxidante a través de las actividades de la superóxido-dismutasa celular y mitocondrial.

La metodología Mitoread RedOx c/mtSOD consiste en la cuantificación de las actividades de SOD celular y mitocondrial.

40

Las células se preincubaron a 37 °C durante 60 minutos con el antioxidante de referencia, el resveratrol 1 µM o los principios activos a las concentraciones predeterminadas. Las células se trataron con el compuesto prooxidante de referencia, el peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM durante 60 minutos. Inmediatamente después, los extractos celulares se prepararon y se conservaron a -80 °C. Las actividades enzimáticas se midieron por un método fluorométrico y enzimático utilizando un lector de microplacas (Varioskan-Thermo). Todos los extractos fueron ensayados por triplicado. Sus efectos se compararon simultáneamente con los controles negativos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y positivos (resveratrol).

45

Propiedad antioxidante a través de la tasa de glutatión total:

La metodología Mitoread RedOx GShtot consiste en la cuantificación de la tasa de glutatión total (GSH + GSSG).

5 Las células se preincubaron a 37 °C durante 60 minutos con el antioxidante de referencia, el resveratrol 1 µM, o el extracto a las concentraciones predeterminadas. Las células se trataron con el compuesto prooxidante de referencia, el peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM durante 60 minutos. Inmediatamente después, los extractos celulares se prepararon y conservaron a -80 °C. La tasa de glutatión total se midió por un método fluorométrico y enzimático utilizando un lector de microplacas (Varioskan-Thermo).

Todos los extractos han sido ensayados por triplicado. Sus efectos se compararon simultáneamente con los controles negativos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y positivos (resveratrol).

Resultados

10 Los efectos de los controles negativos y positivos han sido validados. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM induce un importante aumento de un factor 9,4 en la producción mitocondrial de ROS con respecto a las células no tratadas. El resveratrol 1 µM reduce considerablemente la sobreproducción de ROS mitocondriales inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los queratinocitos (casi 1,3 veces (p = 0,013) (Figura 5).

El extracto de sanícula reduce significativamente la tasa de las ROS mitocondriales inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demostrando una actividad antioxidante eficaz (13 % a 0,001 %, p <0,05 y 38 % a 0,005 %, p <0,001).

15 Los efectos de los controles negativos y positivos han sido validados. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM induce un importante aumento de 7,4 veces la tasa de producción de ROS celulares con respecto a las células no tratadas. El trolox 10 µM reduce considerablemente la sobreproducción de ROS celulares inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los queratinocitos (1,7 veces, p <0,001).

20 En las dos dosis, el extracto de sanícula reduce significativamente la producción de las ROS celulares inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (49 % de media, p < 0,001) (Figura 6).

En los queratinocitos humanos, la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha inducido una tendencia no significativa a la disminución de la actividad de SOD celular de casi el 30 % (p= 0,075) con respecto a las células no tratadas mientras que ha aumentado de manera significativa la actividad de la SOD mitocondrial en casi el 211 % (p = 0,006) con respecto a las células no tratadas.

25 El compuesto de referencia antioxidante, el resveratrol 1 µM, ha aumentado significativamente la actividad SOD celular en casi un 40 % (p <0,036) con respecto a las células no tratadas en respuesta a la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, el resveratrol 1 µM reduce significativamente la actividad de la SOD mitocondrial inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en casi un 66 % (p=0,021), manteniendo un nivel de mtSOD comparable al de las células no tratadas.

30 El tratamiento de los queratinocitos por el extracto de sanícula al 0,001 % conduce a una actividad de SOD celular comparable a la de las células no tratadas. A 0,005 %, el extracto de sanícula ha aumentado la actividad de SOD celular sobre la inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a las células no tratadas en un 76 % (p = 0,012), revelando una regulación al alza de las defensas antioxidantes celulares en respuesta a un estrés oxidativo celular (Figura 7).

35 El extracto de sanícula al 0,001 % ha restaurado la actividad de la SOD mitocondrial comparable a la de las células no tratadas, disminuyendo considerablemente su inducción por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en casi un 80 % (p = 0,008), de manera similar al efecto del resveratrol 1 µM.

El extracto de sanícula al 0,005 % ha mantenido la actividad SOD mitocondrial inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 8).

40 El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM ha aumentado de forma significativa el nivel de glutatión total en casi 2,9 veces con respecto a las células no tratadas (p =0,044), revelando una regulación al alza del glutatión en respuesta al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La preincubación con el resveratrol 1 µM ha reducido significativamente el nivel de glutatión total después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (94 %), restaurando un nivel comparable al de las células no tratadas (p = 0,006).

El extracto de sanícula ha disminuido de manera significativa (como el resveratrol 1 µM), el nivel de glutatión total después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un nivel comparable al de las células no tratadas (Figura 9).

Conclusión

45 La exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido identificada como un inductor de daños celulares, comprometiendo el equilibrio de oxidorreducción en los queratinocitos humanos primarios. Los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM, 1 hora) en los queratinocitos humanos se resumen en la tabla que sigue

Condición de estrés oxidativo	Efectos sobre el estado redox				
	cROS	mtROS	cSOD	mtSOD	GSHtot
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100 µM, 1 hora	↑***	↑***	↓(ns)	↑**	↑**

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

En las condiciones experimentales, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha generado ROS mitocondriales, llevando a la acumulación de los ROS intracelulares. El aumento de la actividad de la SOD mitocondrial y el aumento del nivel de glutatión total son una respuesta al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para contrarrestar el aumento precoz de la producción de ROS.

- 5 El aumento de la SOD mitocondrial y de la GSH pueden ser directamente responsables de la reducción observada de la SOD celular, a través de un bucle retroactivo, lo que explica la disminución de su actividad cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno aportado por el tratamiento supera la actividad de la SOD celular, que convierte O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los efectos del extracto de sanícula combinados con una exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se resumen en la tabla que sigue

Condición de estrés oxidativo	Efectos sobre el estado redox en respuesta a la exposición a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				
	cROS	mtROS	cSOD	mtSOD	GSHtot
Sanícula 0,001%	↓47%	↓13%	Células no tratadas	Células no tratadas	Células no tratadas
Sanícula 0,005%	↓51%	↓39%	↑148% Células no tratadas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100 µM	Células no tratadas

- 10 El extracto de sanícula al 0,001 % es un antioxidante eficaz frente a las ROS mitocondriales y celulares inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como resultado, el extracto de sanícula disminuye la necesidad de aumentar las enzimas antioxidantes SOD y el glutatión, sistema antioxidante no enzimático.

- 15 El extracto de sanícula al 0,005 % realza la actividad de la SOD celular, ya recabada en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, potenciando las primeras defensas antioxidantes.

#### Ejemplo 3

El objetivo de este estudio es presentar el efecto anticontaminación de un extracto de *Furcellaria lumbricalis* a la concentración de 0,5 %.

- 20 Para esto, se ha elegido la contaminación debida al gas de escape de los automóviles que contiene elementos de contaminación comunes a numerosos contaminantes estresantes como el humo de los cigarrillos, CO, NO y NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, pero también benceno, aldehídos, partículas, compuestos orgánicos volátiles (VOC), policlorobifenilos (PCB), metales pesados,... (Dupuis, E., 2006).

El efecto de esta contaminación ha sido medido sobre explantes de piel humana expuestos a la contaminación.

#### Material y método

- 25 Modelo biológico

Explantes de piel humana de 12 mm de diámetro, recogidos después de una cirugía plástica abdominal en una mujer caucásica de 58 años (Biopredic International, Rennes).

#### Productos para ensayo y para referencia

- 30 El extracto ensayado es el producto comercial Hydranov P de Codif, que se recuerda que se trata de un extracto de oligofurcellarano enriquecido en sales marinas obtenido por despolimerización de un furcellarano sulfatado (galactosa y anhidrogactosa) y después rehidratado con una solución enriquecida con sales marinas.

El extracto así obtenido se ha diluido al 0,5 % en agua.

#### Sistema de ensayo

- 35 Después de la recepción de los explantes, estos se estabilizan durante 16 h a temperatura ambiente. Después de esta estabilización, se realiza una medida de la hidratación antes de la aplicación de los productos (T0). Los fragmentos de piel se tratan después con una solución de un extracto de *Furcellaria lumbricalis* al 0,5 % durante 30 minutos. Estos explantes se exponen a continuación al gas de escape de automóviles durante 5 horas. A continuación, se incuban en la interfaz aire/medio en un medio tamponado a largo plazo (Hepes) durante 18 h a 20-

22 °C. Después de 18 h, se realiza una medida de la hidratación (T1). La manipulación realizada sobre estos explantes se esquematiza a continuación:

Tratamiento por el gas

- 5 El gas utilizado en este ensayo proviene de un vehículo diésel (1989) de marca Renault sin filtro de partículas y se recoge utilizando una bolsa hermética estándar (marca SKC ref. Cat No. 236-005).

A título indicativo, la composición del gas es la siguiente:

Concentraciones en µg/m <sup>3</sup>		Concentraciones en µg/m <sup>3</sup>	
Compuesto	Cantidad	Compuesto	Cantidad
1-propeno-2-metilo	1145,44	Octano	42,20
Propeno	1988,62	2,4-Dimetilheptano	34,91
MEK	184,26	Nonano	27,87
Hexano	53,66	Decano	23,90
1-buten-3-ona	49,42	2,4,6-Trimetildecano	13,36
2-butenal	46,34	Undecano	15,56
Benceno	140,12	Etilbenceno	5,60
Ácido acético	181,60	m+p xileno	17,11
Tolueno	42,98	Oxileno	5,88
1-Octeno	21,28	Acetona	72,94

Medida de la hidratación.

a. Principio

- 10 La tasa de hidratación cutánea ha sido estudiada por medio de un Cornéometro® CM 825 MDD (COURAGE & KHAZAKA). Este aparato permite determinar el grado de humedad de las capas cutáneas más externas del estrato córneo. El principio de acción del Cornéometro se basa en la posibilidad para el detector, concebido como un condensador, de modificar su capacidad. La cara del cabezal de medida, en contacto con la piel, modifica su capacidad según el grado de humedad de la piel. Estas modificaciones se transcriben directamente a un sistema informático.
- 15

- Existen diferentes métodos para medir la tasa de hidratación cutánea. Entre ellos, la corneometría es un método clásico en cosmetología. Basada en la posibilidad de que el detector modifique su capacidad en función del grado de humedad de las capas cutáneas más superficiales del estrato córneo, el Cornéometro permite por lo tanto cuantificar, *in vivo* y en directo sobre el hombre, el efecto de productos cosméticos o dermofarmacéuticos sobre la tasa de hidratación del estrato córneo.
- 20

b. Parámetro estudiado

La tasa de hidratación se expresa en unidades arbitrarias.

Un aumento de los valores de hidratación cutánea traduce un efecto hidratante del producto.

Análisis estadístico

- 25 Los datos brutos se transfieren y se tratan utilizando el software Excel. El test utilizado es el test t de Student sobre datos apareados. Una diferencia entre 2 grupos se considera estadísticamente significativa si el valor p es inferior a 0,05, y se anota como \*p <0,05.

Resultados

- 30 En las condiciones del ensayo, la exposición a los gases de escape de automóviles provoca una disminución neta de la hidratación (Figura 1; control + gas con respecto a control - gas).

El extracto de *Furcellaria lumbricalis* ha protegido fuertemente la piel contra la caída de la tasa de hidratación (+ 78 %) en los explantes de piel humana inducida por la contaminación.

Estos resultados se ilustran en la Figura 10.

Conclusión

La exposición a la contaminación provoca una caída en la tasa de hidratación de la piel.

A nivel de los explantes de piel humana, el extracto de *Furcellaria lumbricalis* al 0,5 % protege contra la pérdida de hidratación inducida por la contaminación.

Ejemplos de composiciones según la invención

5 Crema antiarrugas

	%
Carbómero .....	0,30
Glicerina.....	2,00
Dimeticona .....	3,00
Isononanoato de isononilo .....	8,00
Alcohol cetearílico y glucósido estearílico .....	3,50
Tocoferol .....	0,06
Estearato de glicerilo y estearato de PEG-100 .....	2,50
Carbonato de dicaprililo .....	4,00
Hidróxido de sodio .....	0,08
Almidón de tapioca .....	1,50
Goma 4 de biosacáridos .....	1,00
Lampsano .....	0,50
Furcellaria lumbricalis .....	1,00
Diospyros mespiliformis .....	0,50
Sanícula europea .....	0,50
Conservantes .....	c.s.
EDTA disódico .....	0,10
Perfume.....	c. s.
Agua desmineralizada .....	c.s.p. 100

Suero

	%
Etilhexanoato de cetearilo .....	2,50
Heptanoato de estearilo.....	1,50
Triglicérido caprílico/cáprico .....	3,00
Sesquiestearato de PEG-20-metilglucosa.....	2,00
Dimeticona .....	1,50
Tocoferol .....	0,02
Crospolímero de acrilatos/acrilato de alquilo C10-30 .....	0,25
Isononanoato de isononilo .....	3,00

## ES 2 747 436 T3

Benzoato de alquilo C12-15.....	2,50
Hidroxietilcelulosa .....	0,10
Glicerina .....	5,00
Butilenglicol .....	2,00
Hetilhexilglicerina .....	0,20
EDTA disódico .....	0,05
Trometamina .....	0,30
Lampsano .....	0,50
Furcellaria lumbricalis .....	1,00
Diospyros mespiliformis .....	0,50
Sanícula europea .....	0,50
Conservantes .....	c. s.
Perfume.....	c. s.
Agua desmineralizada .....	c.s.p. 100

### Emulsión H/E

	%
Alcohol cetearílico y glucósido estearílico .....	3,50
Estearato de glicerilo y estearato de PEG-100 .....	2,00
Steareth-21 .....	0,50
Glicéridos de coco hidrogenados .....	2,00
Mantequilla de karité .....	1,00
Ciclometicona .....	6,00
BHT .....	0,02
Carbómero .....	0,20
Glicerina .....	5,00
Hidróxido de sodio .....	0,04
Sílice .....	1,40
Acetato de tocoferilo .....	0,20
Dimeticona y dimeticonol .....	0,50
Lampsano .....	0,50
Furcellaria lumbricalis .....	1,00
Diospyros mespiliformis .....	0,50
Sanícula europea .....	0,50
Conservantes .....	c. s.
EDTA tetrasódico .....	0,05

## ES 2 747 436 T3

Perfume.....	c. s.
Agua desmineralizada .....	c.s.p. 100

### Crema de día SPF 20

	%
Etilhexilglicerina .....	0,20
EDTA disódico .....	0,10
Goma xantano .....	0,20
Glicoles .....	5,00
Goma de acacia de Senegal .....	0,01
Salicilato de butiloctilo .....	5,00
Poliacrilato de sodio .....	0,50
Mica .....	0,10
Cetilfosfato de potasio .....	0,50
Butil metoxidibenzoilmetano .....	3,00
Octocrileno .....	2,70
Homosalato .....	10,00
Alcohol cetearílico y glucósido estearílico .....	3,50
Benzoato de alquilo C12-15....	8,00
Almidón de tapioca .....	2,00
Lampsano .....	0,50
Furcellaria lumbricalis .....	1,00
Diospyros mespiliformis .....	0,50
Sanícula europea .....	0,50
Alcohol .....	3,00
Conservantes .....	c. s.
Perfume.....	c. s.
Agua desmineralizada .....	c.s.p. 100

### Emulsión E/H

	%
Dipolihidroxiestearato de PEG 30 .....	4,00
Triglicéridos hidrogenados C16-18 .....	5,00
Copolímero de PEG 45/dodecilglicol .....	1,20
Triglicéridos C8C10 .....	19,00
Aceite de vaselina fluida .....	8,00

## ES 2 747 436 T3

Glicoles .....	10,00
Lampsano .....	0,50
Furcellaria lumbricalis .....	1,00
Diospyros mespiliformis .....	0,50
Sanícula europea .....	0,50
Conservantes .....	c. s.
Perfume.....	c. s.
Agua desmineralizada .....	c.s.p. 100

### Loción hidroalcohólica

	%
Glicoles .....	2,00
Tampón .....	0,40
Cloruro de sodio .....	1,00
Etanol .....	5,00
Lampsano .....	0,50
Furcellaria lumbricalis .....	1,00
Diospyros mespiliformis .....	0,50
Sanícula europea .....	0,50
Trometamina .....	0,80
Conservantes .....	c. s.
Solubilizante .....	c. s.
Perfume.....	c. s.
Agua desmineralizada .....	c.s.p. 100

## REIVINDICACIONES

1. Uso cosmético de un extracto de *Diospyros mespiliformis* o de una composición que lo contiene para proteger la piel contra los efectos cutáneos nocivos de la contaminación atmosférica y/o reparar las manifestaciones cutáneas inducidas por la contaminación atmosférica.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, caracterizado por que la contaminación atmosférica resulta de la presencia de contaminantes interiores o exteriores elegidos entre los agentes oxidantes, el monóxido de carbono, los hidrocarburos y disolventes, el dióxido de azufre, los metales, el formaldehído, el humo de cigarrillos, las partículas o polvo fino en suspensión y las ondas electromagnéticas.
- 10 3. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para prevenir la degradación y/o restaurar los trastornos cutáneos inducidos por la contaminación mediante las siguientes actividades;
- aumento de la cohesión cutánea y del estrato córneo y mejora de la función barrera de la piel;
  - restauración de la homeostasis de los procesos de proliferación y de diferenciación de los queratinocitos;
  - restauración de la matriz dérmica;
  - prevención y restauración de la hidratación cutánea;
- 15 - mejora de la cohesión de las células cutáneas;
- mejora de la comunicación celular;
  - restauración de la unión dermo-epidérmica.
- 20 4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para prevenir y/o corregir el envejecimiento de la piel inducido por la contaminación, en particular, prevenir o corregir las arrugas y líneas finas y/o conservar la luminosidad y/o aumentar la hidratación y/o regular la descamación, mantener o estimular la flexibilidad de la piel sometida a contaminación.
5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el extracto se obtiene por molienda y extracción con disolventes acuosos y/u orgánicos de una parte aérea de la planta.
- 25 6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la composición comprende entre 0,01 y 10 % de extracto en peso.
7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la composición comprende suavizantes, colorantes, agentes activos filmógenos, tensioactivos, perfumes, conservantes, emulsionantes, aceites, glicoles, vitaminas tales como vitamina E, filtros UV.
- 30 8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la composición se presenta en la forma de un gel, una loción, una crema, una emulsión, una leche, un spray.
9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicho extracto está combinado con un extracto de sanícula europea.
10. El uso según la reivindicación 9, caracterizado por que dicho extracto de sanícula europea es un extracto hidrosoluble de las partes aéreas de la planta.
- 35 11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicho extracto, o la combinación de extractos comprende además un extracto de *Furcellaria lumbricalis*.
12. El uso según la reivindicación 11, caracterizado por que dicho extracto de *Furcellaria lumbricalis* comprende oligofurcellano enriquecido con sales marinas.
- 40 13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicho extracto o la combinación de extractos comprende además un extracto de *Lampsana communis*.
14. El uso según la reivindicación 13, caracterizado por que dicho extracto de *Lampsana communis* se obtiene por extracción hidroglicólica de la parte aérea de la planta.
- 45 15. Procedimiento de tratamiento cosmético, para combatir y prevenir los efectos de la contaminación sobre la piel, caracterizado por que se aplica sobre la piel una cantidad adecuada de un extracto de *Diospyros mespiliformis* solo o en combinación con un extracto de Sanícula europea y/o un extracto de *Furcellaria lumbricalis* y/o un extracto de *Lampsana communis* o de una composición que comprende dicho extracto o una de dichas combinaciones.

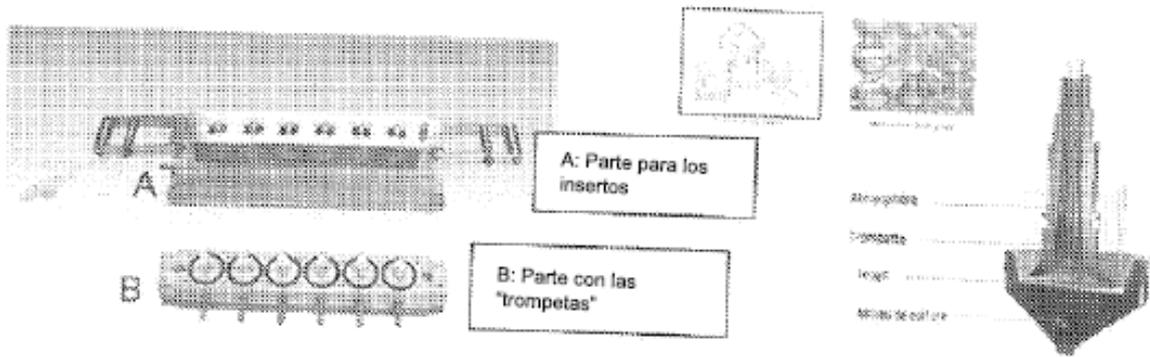


Figura 1

**Inmunomarcaje de la loricrina**

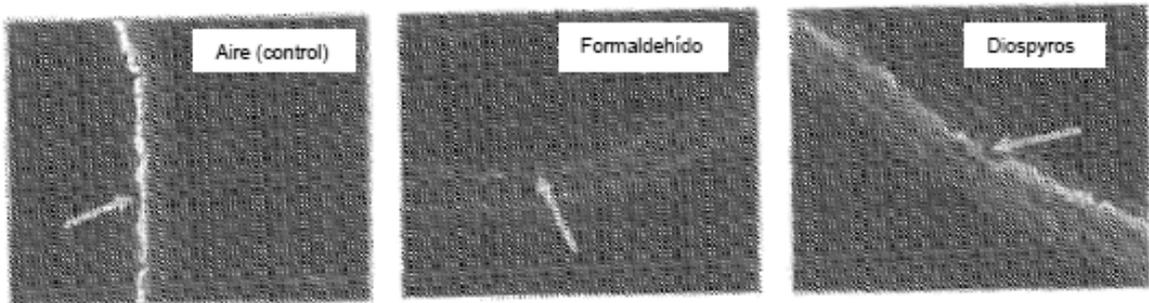


Figura 2A

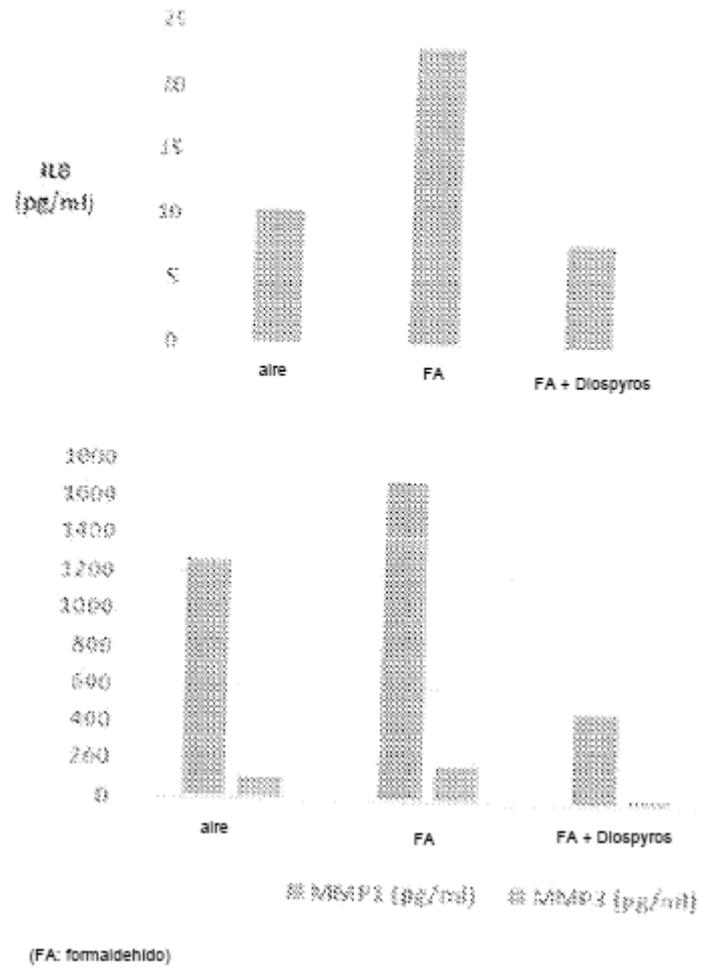


Figura 2B

Inmunomarcaje de la loricrina

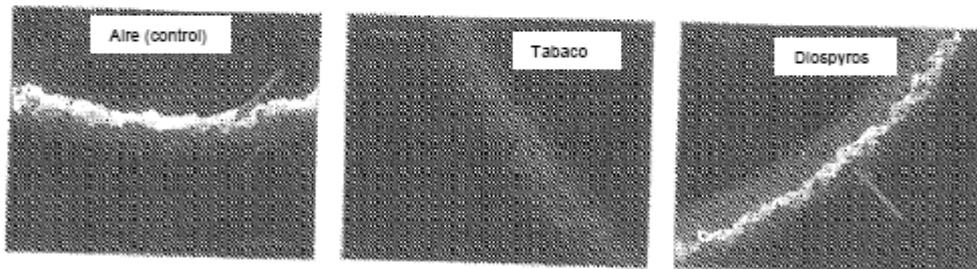


Figura 3A

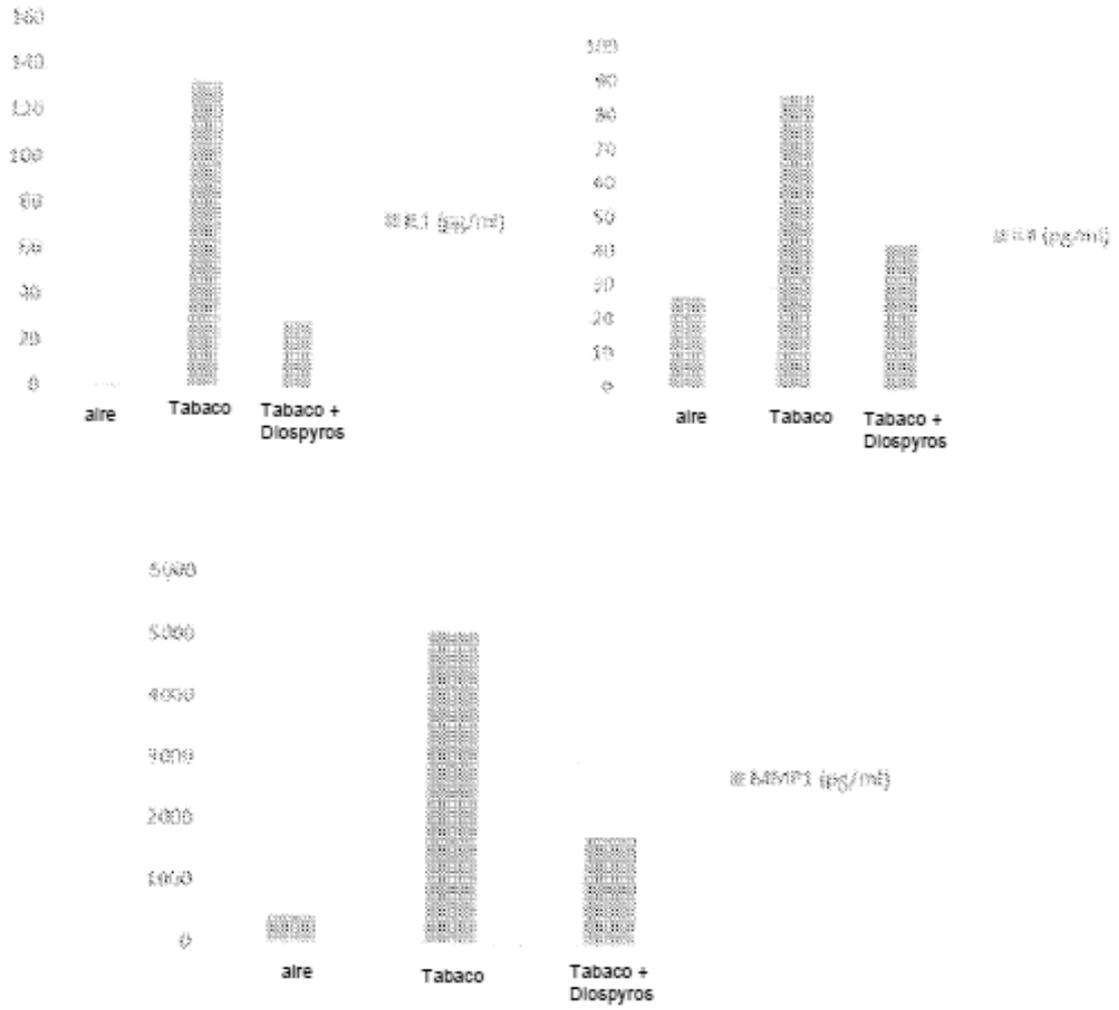


Figura 3B

Inmunomarcage de la loricrina

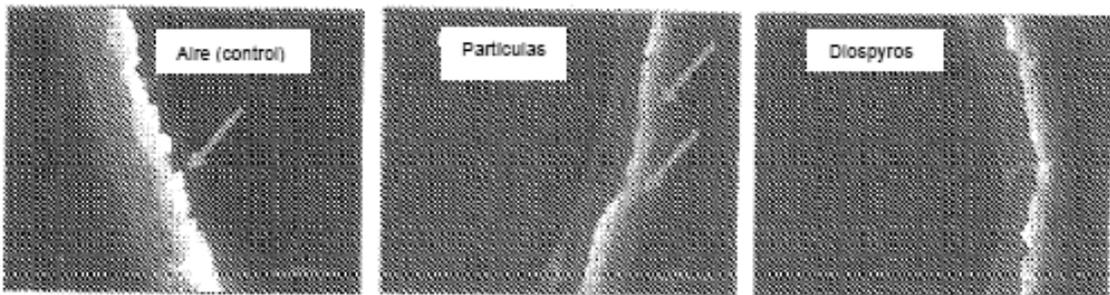


Figura 4A

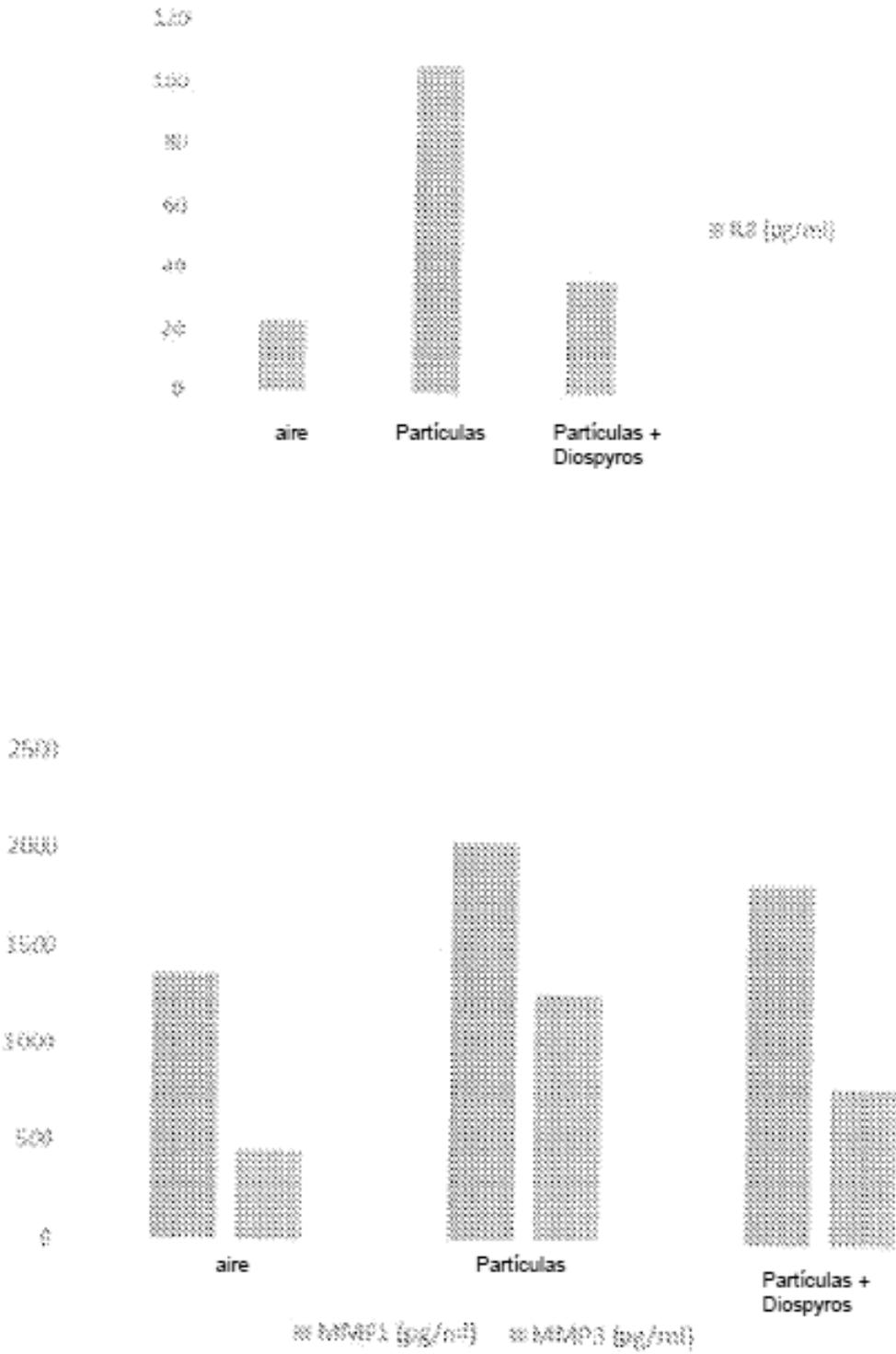


Figura 4B

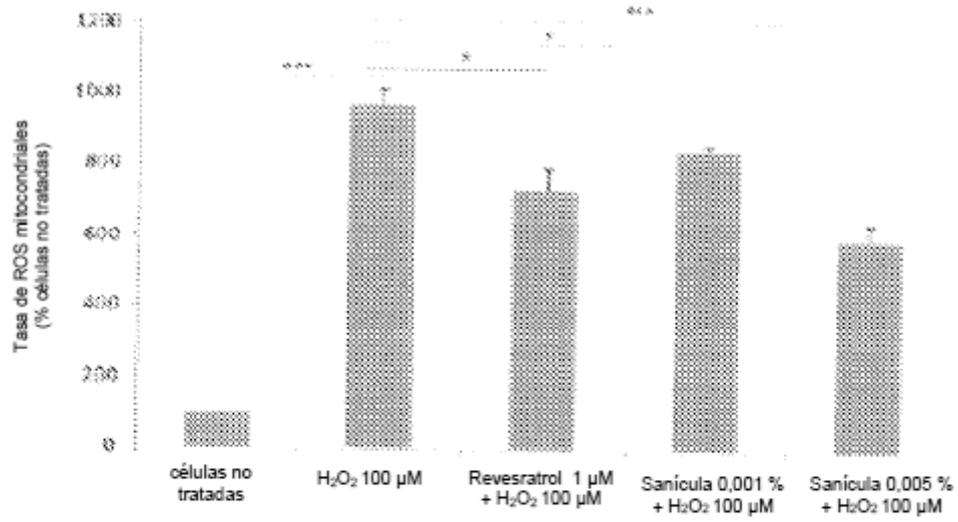


Figura 5

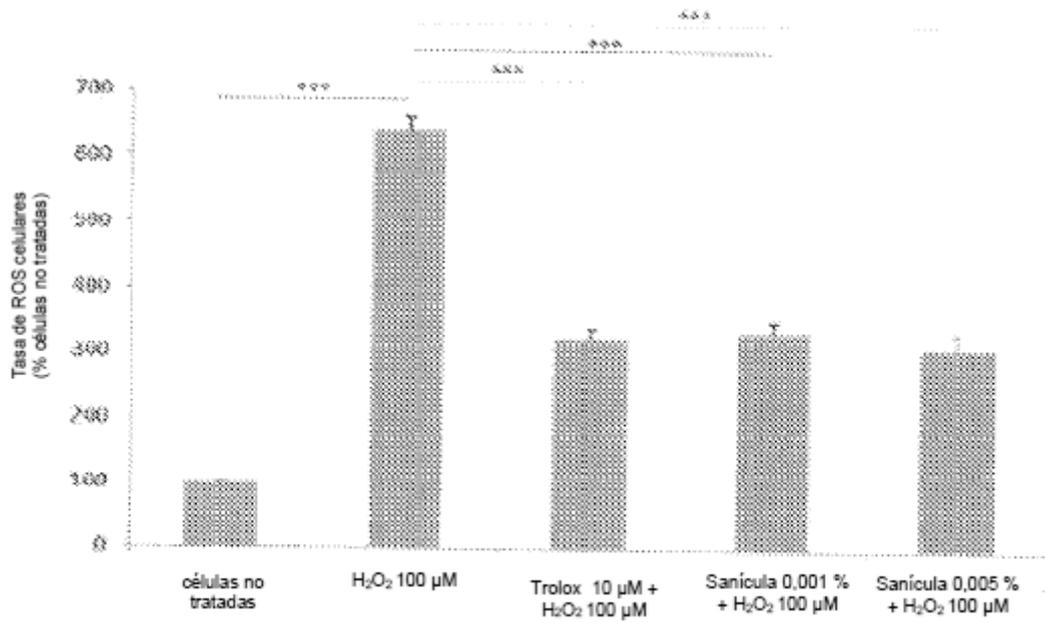


Figura 6

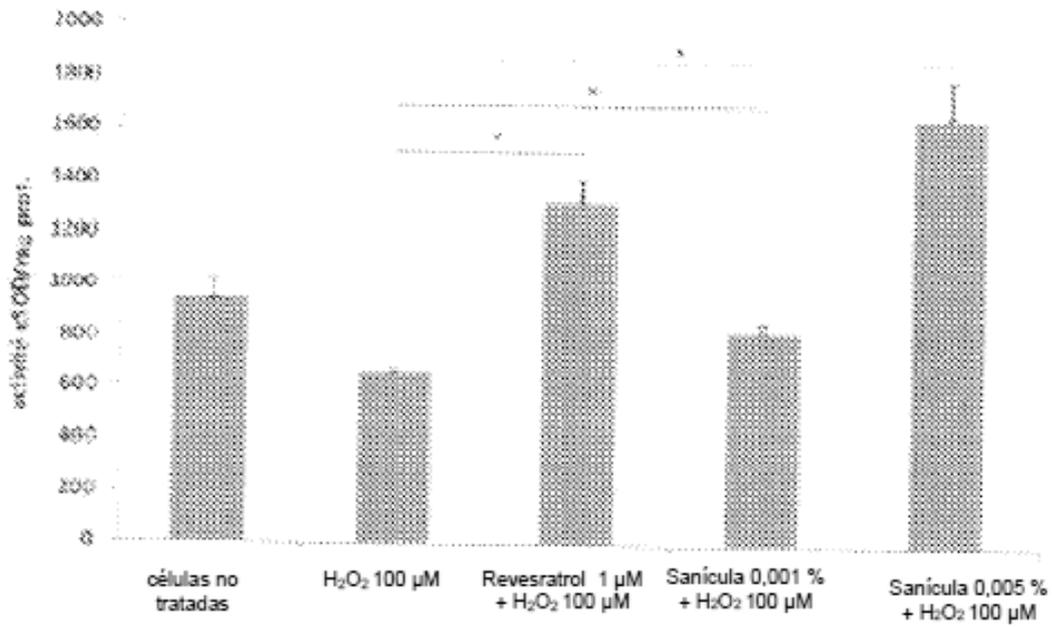


Figura 7

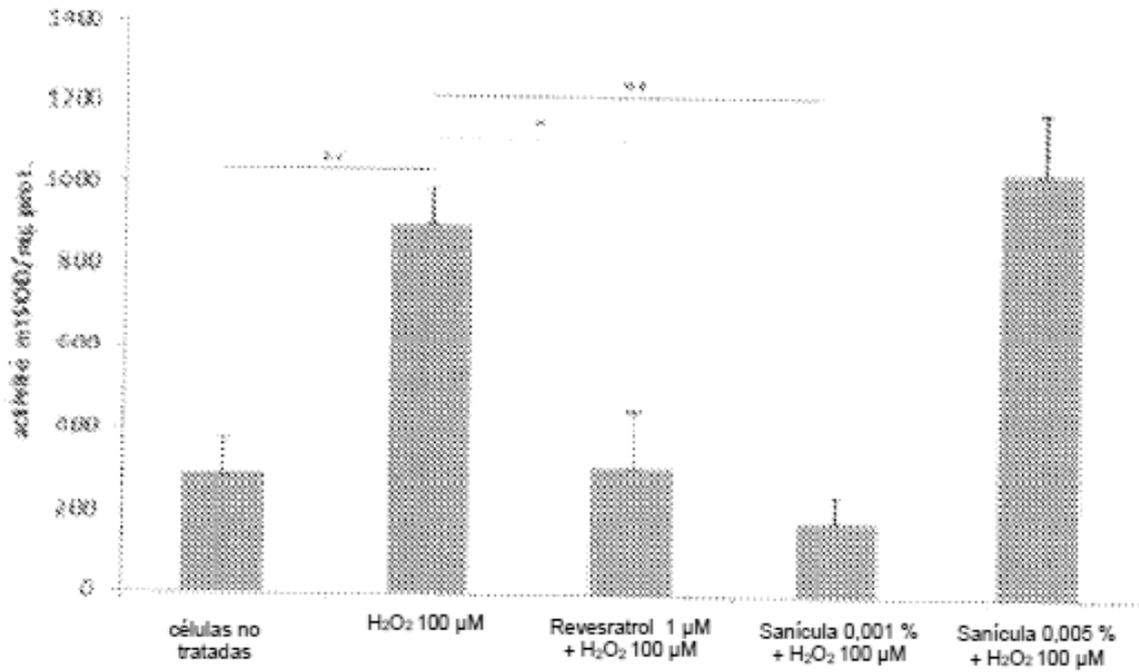


Figura 8

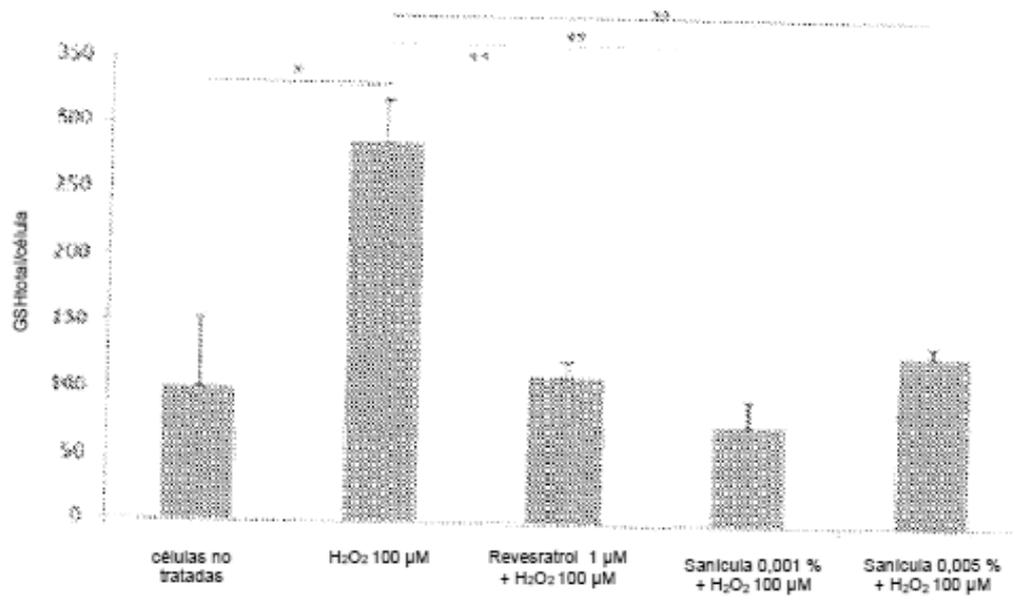
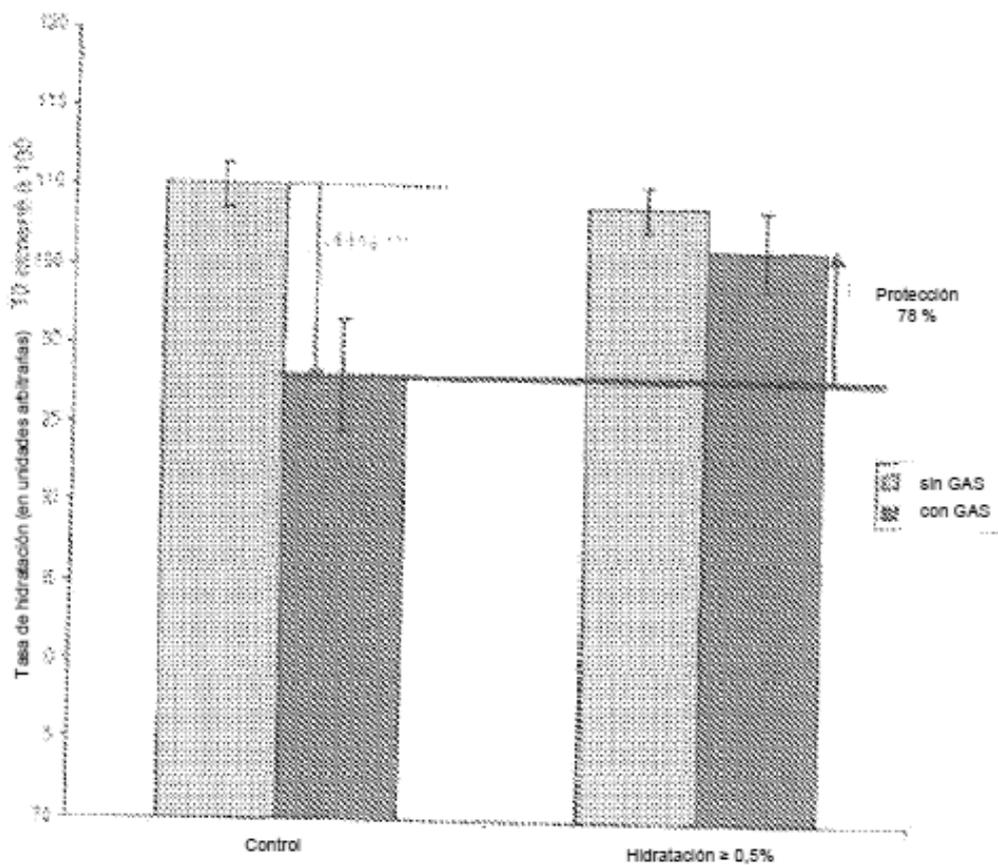


Figura 9



\*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,001 Student T test

Figura 10