



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 248 962**

51 Int. Cl.:
A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **99204230 .9**

96 Fecha de presentación : **09.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1013178**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2000**

54 Título: **Uso cosmético del ácido petroselinico.**

30 Prioridad: **22.12.1998 EP 98310627**
22.12.1998 EP 98310626
17.03.1999 EP 99302067

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.03.2006**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **04.01.2010**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **04.01.2010**

73 Titular/es: **Unilever N.V.**
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL

72 Inventor/es: **Alaluf, Simon;**
Hu, Heng-Long;
Green, Martin, Richard;
Powell, Jonathan, Richard;
Rawlings, Anthony, Vincent;
Rogers, Julia, Sarah;
Watkinson, Allan y
Cain, Frederick, William

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 248 962 T5

DESCRIPCIÓN

Uso cosmético del ácido petroselinico.

5 El ácido petroselinico es un compuesto bien conocido que por ejemplo está presente en aceite de cilantro en cantidades relativamente altas. Su uso en productos alimentarios se describe también en la bibliografía. Por ejemplo el documento EP 777971 describe que se pueden obtener composiciones grasas a partir de grasas que tienen altos contenidos de ácidos grasos monoinsaturados asimétricos, tales como ácido petroselinico, es decir, PSA (> 79% en peso) y que simultáneamente tienen contenidos bajos de ácidos en trans (< 5% en peso). Las composiciones grasas
10 obtenidas se pueden usar como un reemplazador de grasas con un número de beneficios tales como proporcionar buenas propiedades de textura a la comida, mientras que no elevan los niveles de LDL-colesterol en el suero sanguíneo. Cuando se considera el ejemplo 5, en particular la tabla 3 de esta solicitud de patente alguien debe concluir que un buen rendimiento de producto sólo se obtiene si los contenidos de grasa aplicados contienen aproximadamente 12% en peso de PSA. Los productos basados en grasas sin PSA funcionan mal (= grasa control 1). Las grasas con
15 sólo pequeñas cantidades de PSA son aún granulosas, mientras que usando una grasa con un alto contenido de PSA (= grasa 4 con aproximadamente 64% en peso de PSA por medio del aceite de cilantro) tiene una apariencia general pobre. Los productos alimentarios que se indican son margarinas, aliños, confecciones, patés, postres helados, helados, mayonesa, mostazas, queso, salsas para recubrir, pan, galleta alargada (biscuit), productos lácteos, aceites para freír, CBE, caramelo, carne, productos del huevo, productos de frutos secos, productos vegetales o frutales, productos para
20 napar, cremas, puddings, galletas redondas (cookies), pastas, tartas, galletas saladas, pasteles, panecillos e ingredientes o por tanto premezclas. Como PSA es el ingrediente activo que proporciona los beneficios para la salud al producto alimenticio hay una gran necesidad de ser capaces de usar grasas con altos niveles de PSA pero que funcionen bien cuando se apliquen a productos alimentarios. Es decir, la apariencia de los productos alimentarios sería buena también.

25 Se conoce también que ciertos ácidos grasos se pueden usar como agente antiinflamatorio, por ejemplo Afifi y col. "Some pharmacological activities of essential oils of certain umbelliferous fruits" *Vet. Med. Journal Giza* vol. 42, nº. 3, 1 de enero de 1994, y también Yagaloff y col. "Essential fatty acids are antagonists of the Leukotriene B4 Receptor" *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty acids*, vol. 52, nº. 5, 1 de enero de 1995. Estas publicaciones
30 mencionan ácido petroselinico.

Un problema del consumidor bien reconocido está formado por el envejecimiento de la piel. En años recientes la demanda de procedimientos para mejorar la apariencia de la piel y, en particular, para reducir o prevenir los signos
35 visibles de piel arrugada, envejecida y/o fotodañada ha crecido enormemente. Se sabe en la técnica que los niveles de colágeno, una proteína estructural dérmica y de decorina, un proteoglicano estructural en la piel se reducen significativamente con piel envejecida y/o fotodañada (Lavker y col. *J. Inv. Derm.* 1979 73:79-66, Bernstein y col. *Lab. Invest.* 1995 72: 662-669). La reducción en estas proteínas se asocia con un decrecimiento en la fuerza de tensión de la piel que causa arrugas y relajamiento.

40 La investigación extensiva se ha centrado en identificar activos que tienen actividad antienvjecimiento. Uno de los activos más en uso es ácido retinoico, que proporciona retirada de las arrugas y la reparación de la piel a través de estímulo por ejemplo mediante síntesis de colágeno (por ejemplo Griffiths y col. *N. Eng. J. Med.* 1993 329: 530-535). De acuerdo con el documento GB 2 181 349 se encontró otra solución en el uso de triglicéridos derivados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en composiciones cosméticas o dermatológicas. Estas composiciones
45 son de esta manera no comestibles en general porque contendrán también componentes no comestibles. Además los triglicéridos derivados de estos ácidos grasos poliinsaturados son inestables en particular con respecto a la estabilidad con oxígeno.

50 Los inventores estudiaron si podían encontrar un componente natural que se pudiera usar como agente antienvjecimiento sin crear problemas de efectos secundarios y no tener los aspectos negativos de las composiciones antienvjecimiento conocidas.

55 El estudio de la actividad antienvjecimiento resultó en el hallazgo de los autores de la invención de que derivados del ácido petroselinico (es decir ácido graso libre, éster de alquilo corto, siendo C₁-C₄ corto, ésteres de ceras, mono, di o triglicéridos) se pueden aplicar como un agente antienvjecimiento que actúa estimulando los niveles de dos proteínas estructurales en la dermis de la piel, colágeno y decorina.

60 Por lo tanto la invención de los inventores presentes se refiere al uso de composiciones comestibles que contienen ácido petroselinico para la preparación de composiciones alimentarias o de suplementos alimentarios funcionales, en los que la composición que contiene ácido petroselinico se usa como un componente antienvjecimiento que estimula los niveles de decorina con un impacto positivo en afecciones cutáneas seleccionadas del grupo constituido por arrugamiento y flaccidez.

65 Las composiciones alimentarias funcionales están definiéndose como composiciones de alimentación que contienen al menos un componente con un beneficio para la salud. Los suplementos alimentarios están definiéndose como composiciones que no se usan como comida por sí mismas, pero que se usan como suplementos del consumo de comida diario, en general en la forma de ingredientes alimentarios esenciales encapsulados.

ES 2 248 962 T5

Estas composiciones comestibles que contienen ácido petroselinico se pueden aplicar en muchas formas diferentes, pero los autores de la invención prefieren aplicar estas composiciones como una composición que comprende 5-99,9% en peso de grasa o mezcla de grasas.

5 Las grasas que se pueden usar en las composiciones que contienen el derivado de ácido petroselinico se pueden seleccionar del grupo constituido por: equivalentes de manteca de cacao, aceite de palma o fracciones del mismo, aceite de palmiste o fracciones del mismo, mezclas interesterificadas de grasas anteriores, grasas endurecidas o fracciones de las mismas, aceites líquidos, seleccionados de aceite de girasol, aceite de girasol altamente oleico, aceite de soja, aceite de colza, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de alazor altamente oleico, aceite de maíz, aceites
10 MCT, aceites líquidos endurecidos o fracciones de los mismos y mezclas de los presentes.

Estas grasas son casi todas grasas naturales (siendo la excepción aceites MCT los cuales son grasas sintéticas basadas en ácidos grasos de cadena media es decir ácidos grasos con 6-12 átomos de carbono).

15 El nivel del ácido petroselinico en las composiciones que los autores de la invención pueden aplicar para sus propósitos es 2-80% en peso, preferiblemente 5-40% en peso de derivado del ácido petroselinico (calculado como ácido petroselinico).

Como ya se indica anteriormente encontramos que el ácido petroselinico se pudo usar en diferentes formas. Se
20 obtuvieron muy buenos resultados usando el ácido petroselinico como ácido graso libre, o en una forma en la que está unido a un armazón de glicerol como en mono-, di- o triglicéridos. En este último caso los glicéridos deben contener al menos un resto ácido petroselinico. Otras formas son ésteres de alquilo cortos del ácido petroselinico, significando corto que tiene de uno a ocho, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono. Además se pueden aplicar ésteres de ceras, es decir ésteres de alcoholes cadena larga de ácido petroselinico. Por supuesto también se pueden usar mezclas de las
25 formas anteriores.

Los inventores también encontraron que el efecto antienvjecimiento del ácido petroselinico se puede incrementar, incluso en un modo sinérgico usando el derivado del ácido petroselinico en combinación con uno o más antioxidantes. Los ejemplos típicos de antioxidantes útiles se pueden seleccionar del grupo constituido por tocoferoles naturales
30 o sintéticos, polifenoles naturales, en particular como se presentan en extractos de té, BHT, BHA, desoxidantes de radicales libres y enzimas con propiedades antioxidantes. De estos antioxidantes autores de la invención prefieren los tocoferoles y los polifenoles como se presentan la mayoría en extractos de té.

Ejemplos

35 *Metodología*

Procedimiento Para Medir Síntesis de Procolágeno-I y Decorina En Fibroblastos Dérmicos Humanos

40 *Preparación de Medio Acondicionado de Fibroblastos Dérmicos*

Los fibroblastos del prepucio humano primarios en el pasaje 2 (P2) se sembraron en placas de 12 pocillos a 10000 células/cm² y se mantuvieron durante 24 horas en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% y oxígeno al 4% en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternero fetal al 10%. Después
45 de este tiempo las células se lavaron con DMEM libre de suero y después se incubaron en DMEM libre de suero recién preparado durante unas 60 horas adicionales. Las monocapas de fibroblastos se lavaron después de nuevo con DMEM libre de suero. Se añadieron los reactivos de ensayo (ácido petroselinico, EGG y ácido gálico) y los controles de vehículo a las células por triplicado en un volumen final de 0,4 ml/pocillo de DMEM libre de suero recién preparado y se incubaron durante unas 24 horas adicionales. Este medio acondicionado de fibroblastos bien se analizó
50 inmediatamente o bien se congeló repentinamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C para futuros análisis. Las células se contaron después y los datos del análisis de transferencia por puntos se estandarizaron subsiguientemente al número de células.

Ensayo de Transferencia por Puntos para la Proteína Decorina en Medio Acondicionado de Fibroblastos Dérmicos

55 Las muestras de medio acondicionado de fibroblastos dérmicos tratados con vehículo (como un control) o con reactivos de ensayo se suplementaron con ditiotreitol 20 mM (dilución 1:10 de solución de reserva 200 mM) y dodecilsulfato de sodio al 0,1% (dilución 1:100 de solución de reserva al 10%), se mezclaron bien y después se incubaron a 75°C durante 2 minutos. Se generó un estándar para el ensayo mediante dilución en serie de medio acondicionado de fibroblastos puro a partir de fibroblastos sembrados a 10000 células/cm² en un matraz de 175 cm² y mantenidos
60 en DMEM libre de suero como se describe anteriormente. Las muestras de ensayo se aplicaron subsiguientemente por triplicado a una lámina prehumedecida de membrana de transferencia Immobilon-P usando el Aparato de Bio-Dot de 96 pocillos de Bio-Rad como se describe en los manuales de los fabricantes. Se aplicaron aproximadamente 200 µl de medio por pocillo. Se permitió al medio filtrarse a través de la membrana por la fuerza de la gravedad (30 minutos) después de lo cual la membrana se lavó dos veces con PBS (200 µl). Estos lavados con PBS se dejaron
65 filtrar a través de la membrana por la fuerza de la gravedad (2 x 15 minutos). El aparato de Bio-Dot estaba unido a un colector de escape de vacío y un tercio y el lavado con PBS final se llevó a cabo bajo succión. El aparato se desmontó, la membrana se retiró y rápidamente se cortó como fue necesario antes de situarse en tampón de bloqueo durante

toda una noche a 4°C. Las membranas preparadas para análisis de decorina se bloquearon con seroalbúmina bovina al 3% (peso/volumen) (BSA)/Tween 20 al 0,1% (volumen/volumen) en tampón fosfato salino (PBS), mientras aquellos análisis de procolágeno-I se bloquearon con leche en polvo seca descremada al 5% (peso/volumen)/Tween 20 al 0,05% en PBS. El día siguiente, las membranas se probaron con dilución 1:10000 de anticuerpos primarios para decorina humana (policlonales de conejo; Biogenesis) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron subsiguientemente con TBS/Tween 20 al 0,05% (3 x 5 minutos) y después se incubaron con dilución 1:1000 de fragmentos F(ab')₂ anti-rata o anti-conejo conjugados con ¹²⁵I (Amersham) como se requirió durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esto las tiras de Immobilon se lavaron con TBS/Tween 20 (3 x 5 minutos) antes de dejarse secar al aire a temperatura ambiente. Las membranas secadas se envolvieron en celofán y se expusieron a una pantalla de phosphor de almacenaje Molecular Dynamics durante 16-18 horas. Al final de este tiempo la pantalla expuesta se escaneó mediante un phosphorimager (Molecular Dynamics Phosphorimager SF) usando software ImageQuant™. La intensidad de los puntos se evaluó por análisis de imagen asistido por computador usando las herramientas de cuantificación en ImageQuant™, estandarizado al número de células y los efectos de diversos reactivos de ensayo en síntesis de decorina y de procolágeno-I se determinaron en relación a un valor de control tratado con vehículo de 100 unidades arbitrarias.

Ejemplos

Efectos antienvjecimiento - determinados mediante medida de niveles de decorina y sinergia con antioxidantes

Se ha demostrado que el ácido petroselinico estimula los niveles de decorina en fibroblastos, consistentes con reparación dérmica y actividad antienvjecimiento (Tabla 1). Los antioxidantes tales como ECGC, ácido gálico, diadzeína y genisteína pueden ejercer también este efecto (Tabla 2). En combinación, se observa un estímulo sinérgico en niveles de decorina (Tabla 3).

TABLA 1

Estimulación de decorina mediante ácido petroselinico.	
Ácido petroselinico (µM)	Decorina (% de control)
0	100,0 ± 13,6
1	137,6 ± 13,3
10	152,5 ± 14,2

La producción de decorina mediante fibroblastos se determinó en células control (sin tratamiento) y en células tratadas con ácido petroselinico. Los datos se representaron como media +/- desviación estándar según niveles de decorina como un porcentaje del control (sin ácido petroselinico). Cada punto de los datos se determinó por triplicado. Todos los valores de ácido petroselinico se incrementaron significativamente comparados con el control.

TABLA 2

Estimulación de decorina mediante antioxidantes	
Antioxidantes	Decorina (% de control)
EGCG (µg/ml)	
0	100,0 ± 6,4
1	167,5 ± 11,8
2,5	188,6 ± 9,4
5	258,2 ± 6,1
Ácido gálico (µg/ml)	
0	100,0 ± 7,0
1	136,9 ± 4,2
2,5	163,4 ± 6,5
5	161,8 ± 6,6

ES 2 248 962 T5

La producción de decorina mediante fibroblastos se determinó en células control (sin tratamiento) y en células tratadas con antioxidantes. Los datos se representaron como media \pm desviación estándar para niveles de decorina como un porcentaje del control (sin antioxidantes). Todos los valores de antioxidantes se incrementaron significativamente comparados con el control. Cada punto de los datos se determinó por triplicado.

TABLA 3

Estimulación sinérgica de decorina mediante ácido petroselínico y antioxidantes	
Tratamientos	Decorina (% de control)
Control	$100 \pm 1,2$
Ácido petroselínico (0,01 M)	$93,7 \pm 10,3$
EGCG (0,005 $\mu\text{g/ml}$)	$118,4 \pm 3,1$
Ácido petroselínico (0,01 M) + 0,005 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG	$140,5 \pm 16,7$
Control	$100,0 \pm 3,5$
Ácido petroselínico (0,01 M)	$91,6 \pm 5,1$
EGCG (0,05 $\mu\text{g/ml}$)	$111,7 \pm 9,9$
Ácido petroselínico (0,01 M) + 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG	$131,2 \pm 9,2$
Control	$100,0 \pm 7,7$
Ácido petroselínico (0,01 M)	$102,7 \pm 4,5$
EGCG (0,5 $\mu\text{g/ml}$)	$120,2 \pm 3,7$
Ácido petroselínico (0,01 M) \pm 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de EGCG	$155,9 \pm 8,9$
Control	$100,0 \pm 3,3$
Ácido petroselínico (0,01 M)	$100,9 \pm 8,2$
Ácido gálico (0,001 $\mu\text{g/ml}$)	$96,6 \pm 7,4$
Ácido petroselínico (0,01 M) + 0,001 $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico	$129,2 \pm 13,9$
Genisteína (1 μM)	$101,7 \pm 2,3$
Ácido petroselínico (0,01 μM)	$117,3 \pm 4,5$
Genisteína + ácido petroselínico	$130,2 \pm 9,0$
Daidzeína 0,1 μM	$115,4 \pm 5,5$
Ácido petroselínico 0,01 μM	$104,3 \pm 3,0$
Daizdeína + ácido petroselínico	$130,8 \pm 4,4$

La producción de decorina mediante fibroblastos se determinó en células control (sin tratamiento) y en células tratadas con ácido petroselínico y/o con antioxidante. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar ($n = 3$) para niveles de decorina como un porcentaje del control (sin antioxidante). Se observó un efecto sinérgico en estimulación de niveles de decorina tanto de antioxidantes como de ácido petroselínico, comparado con el control.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso cosmético de una composición comestible que contiene 2-80% en peso de ácido petroselínico como un componente antienvjecimiento con un impacto positivo en afecciones de la piel seleccionadas del grupo constituido por arrugamiento y flaccidez.

10 2. Uso de una composición comestible que contiene ácido petroselínico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición que contiene el ácido petroselínico se usa como una composición que comprende 5-99,9% en peso de grasa o mezcla de grasas.

15 3. Uso de una composición comestible que contiene ácido petroselínico de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la grasa en las composiciones que se usan se selecciona del grupo constituido por: equivalentes de manteca de cacao, aceite de palma o fracciones del mismo, aceite de palmiste o fracciones del mismo, mezclas interesterificadas de grasas anteriores, grasas endurecidas o fracciones de las mismas, aceites líquidos, seleccionados de aceite de girasol, aceite de girasol con ácido oleico elevado, aceite de soja, aceite de colza, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de alazor con ácido oleico elevado, aceite de maíz, aceites MCT, aceites líquidos endurecidos o fracciones de los mismos y mezclas de los mismos.

20 4. Uso de una composición comestible que contiene ácido petroselínico de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en el que el ácido petroselínico que contiene composición contiene 5-40% en peso de ácido petroselínico.

25 5. Uso de una composición comestible que contiene ácido petroselínico de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido petroselínico se aplica en la forma de ácido graso libre, o en la forma de mono-, di- o triglicérido con al menos un grupo ácido petroselínico, o en la forma de ésteres de cera del ácido petroselínico o en la forma de ésteres de alquilo C1-C4 del ácido petroselínico o como mezclas de los mismos.

30 6. Uso de una composición comestible que contiene ácido petroselínico de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que la composición comestible contiene también un antioxidante, seleccionado preferiblemente del grupo constituido por tocoferoles naturales o sintéticos, polifenoles naturales, en particular como se presenta en extractos de té, BHT, BHA, desoxidantes de radicales libres y enzimas con propiedades antioxidantes.

35

40

45

50

55

60

65