

Pigments végétaux

A. SIMONNET*, C. BRUNET**, N. PORTAL*, I. CLONIER**, S. MASSON*, A. DE LA SAYETTE**, P. BRENAC***, A. GUEZENNEC*, J. GUESNET* ● *Les T.A.P.E. (Tinctorial Active Plant Extracts) sont de puissants antioxydants qui ouvrent une nouvelle voie dans la formulation de produits de maquillage.*

GRÂCE À LA COLLABORATION de YSL Beauté R&D et Arrdhor Critt Horticole (Centre régional d'innovation et de transfert de technologies), les pigments végétaux, ces molécules à la fois sources de couleurs et de protection des plantes, sont maîtrisés pour apporter aux produits de maquillage une efficacité protectrice et des teintes subtiles.

T.A.P.E. : des flavonoïdes stabilisés

Les flavonoïdes sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs^{1,2}, du jaune orangé au bleu en passant par le pourpre ou le rouge. Ces pigments végétaux jouent un rôle important dans les mécanismes de protection des plantes pour faire face aux agressions de l'environnement³. Leurs puissantes propriétés antioxydantes en font des molécules d'intérêt pour l'industrie cosmétique. Cependant, l'incorporation de flavonoïdes dans des produits cosmétiques reste très délicate. En effet, leur structure moléculaire, dont dépendent leur couleur et leurs propriétés antioxydantes, les rend particulièrement instables, et incompatibles avec la plupart des formes galéniques.

YSL Beauté R&D et le Critt Horticole ont uni leurs savoir-faire pour stabiliser ces flavonoïdes et les rendre compatibles avec les formules cosmétiques. Les flavonoïdes stabilisés ou T.A.P.E. (Tinctorial Active Plant Extracts) constituent de nouveaux ingrédients actifs caractérisés par leur pouvoir antioxydant et des couleurs subtiles : ils ont naturellement trouvé leur application dans la réalisation d'une gamme de maquillage aux propriétés protectrices.

Matériel et méthodes

Trois espèces végétales ont été sélectionnées pour leur richesse en flavonoïdes : la fleur de Cosmos particulièrement riche en aurones² et chalcones², le bois de Pernambouc très concentré en braziline² et le bois de Quebracho pour sa teneur en proanthocyanidines² (figure 1).

♦ Évaluation de la couleur des pigments végétaux

La couleur des pigments végétaux a été mesurée par absorption UV après solubilisation dans du méthanol à une concentration finale

* YSL Beauté R&D, Neuilly-sur-Seine 92521

** Arrdhor Critt Horticole, Rochefort 17300

*** Couleurs de Plantes, Rochefort 17300

Plant Pigments: antioxidant colours

T.A.P.E. (Tinctorial Active Plant Extracts) are potent antioxidants for a new generation of innovative makeup products

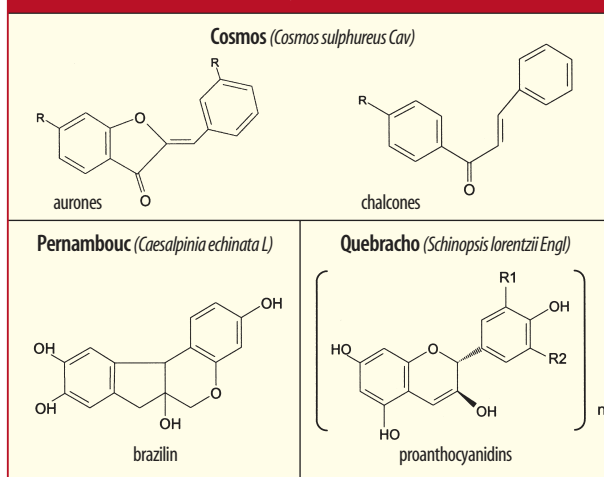
Thanks to the collaboration between YSL Beauté R&D and ARR DHOR CRITT Horticole (Technologies Transfer and Innovation Regional Center), the plant pigments, these molecules which give colours and protection to plants, are overcome to provide anti-free radical properties and fine shades to makeup products.

T.A.P.E. : Stabilized flavonoids

Flavonoids are the only molecules among the plant kingdom capable of giving such a full range of colours, from orange yellow and red, to purple and blue. These plant pigments are well-known for their role in plants protection mechanisms

against environmental stresses. As a matter of fact, their strong antioxidant properties are extremely interesting for cosmetic industry. However, the use of flavonoids in cosmetic products stays very tricky. Indeed, their molecular structural characteristics representing the basis for both, their colour and their antioxidant properties, make them unstable and incompatible with most of cosmetic formulas. YSL Beauté R&D and the CRITT Horticole joined their know-how to stabilize these flavonoids in order to make them compatible with cosmetic formulations. The resulting stabilized flavonoids or T.A.P.E (Tinctorial Active Plant

Fig. 1 – Les flavonoïdes du Cosmos, du Pernambouc et du Quebracho/Flavonoids of Cosmos, Pernambouc and Quebracho



des couleurs antioxydantes

de 50 µg/ml. Cette solution est filtrée à 0,45 µm. Les longueurs d'onde maximales sont déterminées pour chaque extrait par balayage spectral de 200 à 800 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon 941.

◆ **Couleur des T.A.P.E. purs et inclus dans un fard à paupières**
La couleur des T.A.P.E. ainsi que celle des fards à paupières a été déterminée par spectrophotométrie en réflexion Minolta 3500. Les produits sont placés en cuve optique ronde, puis tassés automatiquement. Les mesures $L^*a^*b^*$ sont prises par le dessous avec un masque large (LAV) et en spéculaire inclus (SCI).

◆ **Obtention des T.A.P.E.**

Les pigments végétaux extraits dans un mélange eau/éthanol ont été séchés et transformés par fixation sur un support, selon un procédé s'inspirant de la tradition de traitement des extraits de plantes tinctoriales. Ce dernier a fait l'objet d'adaptations spécifiques pour assurer le maintien des propriétés antioxydantes et une parfaite compatibilité avec les formules cosmétiques.

Chaque T.A.P.E. est caractérisé par une mesure colorimétrique $L^*a^*b^*$ permettant également la validation de la reproductibilité des extraits obtenus.

◆ **Formulation des fards à paupières**

Un fard à paupière témoin a été formulé selon une formule classique avec 12 % d'oxyde de fer. Le Fard à paupière T.A.P.E. a été formulé en incorporant 12 % d'un mélange à part égale des trois T.A.P.E. précédemment obtenus, en substitution totale de l'oxyde de fer présent dans le fard à paupières témoin (figure 2).

◆ **Pouvoir antiradicalaire des pigments végétaux solubles**

L'activité anti-radicalaire des pigments végétaux solubles a été mesurée au moyen du test biochimique « Amplex Red Catalase Assay » (kit A-2218 de Molecular Probes) basé sur la mesure de l'activité catalase du produit à l'essai sur une solution titrée de peroxyde d'hydrogène. Le réactif réagit avec le peroxyde d'hydrogène non transformé présent dans le milieu réactionnel, en formant un composé détecté par fluorescence. Les pigments végétaux sont solubilisés dans l'éthanol dans une gamme de concentrations allant de 0,1 µg/ml à 10 µg/ml, le témoin positif (hydroxyanisole butylé ou BHA) a été mis en solution à 50 µM et 500 µM. Un contrôle éthanol seul est réalisé pour vérifier l'absence d'interférence du solvant. Le pourcentage d'intensité de fluorescence mesuré est inversement proportionnel à l'activité anti-radicalaire.

◆ **Pouvoir antiradicalaire des T.A.P.E. purs et inclus dans un fard à paupières**

L'efficacité antiradicalaire des T.A.P.E. et des fards à paupières a été mise en évidence à l'aide d'un test de peroxydation lipidique *ex-vivo*, sur explants de peau. Cette méthode permet d'étudier les effets de produits insolubles par application topique sur les explants maintenus en survie. Une cytotoxicité préalable, réalisée à l'aide d'un test au MTT (3-(4-5-diméthylthiazol)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide), a permis de déterminer les concentrations à tester. ●●●

Extracts) are new active ingredients characterized by antioxidant properties and nice colours: they naturally find their application in a protective makeup products range.

Material and Methods

Tree plant species were specifically selected for their richness in flavonoids: the Cosmos flower particularly for its content in aurones² and chalcones², the Brazil Wood very concentrated in brazilin² and the Quebracho Wood for its content in proanthocyanidins² (Figure 1).

◆ **Colour measurement of plant pigments**

The colour of plant pigments were measured by UV absorption after solubilization in methanol at a final concentration of 50µg/ml and filtration at 0.45µm. The maximum wavelengths were determined for each extract by spectral scan analysis (from 200 to 800 nm) with a spectro-photometer UVIKON941.

◆ **Colour measurements of T.A.P.E. , pure or included in an eye-shadow**

The colours of T.A.P.E. and eye-shadows were measured with reflective spectrophotometer Minolta 3500. The products were

introduced into an optical round pot and automatically pressed. $L^*a^*b^*$ measurements were taken from underneath with a wide mask (LAV) and specular included (SCI).

◆ **T.A.P.E. development**

The plant pigments were obtained from hydro-ethanolic extraction, then dried and transformed by fixing on a filler, in accordance with a process derived from traditional tinctorial plants extracts processing. This process was specifically adapted to insure both, antioxidant properties and perfect compatibility with cosmetic formulas.

Each T.A.P.E. was characterized by $L^*a^*b^*$ measurements to control its reproducibility.

◆ **Eye-shadows formulation**

A control eye-shadow was made, including, as usual, 12% of iron oxide. The T.A.P.E. eye-shadow was formulated with 12% of a mixture of the three T.A.P.E. in equal parts, replacing the iron oxide of the control eye-shadow (Figure 2).

◆ **Free radical scavenging activity of soluble plant pigments**

The free radical scavenging activity of plant pigments was assessed by using the biochemical Amplex Red Catalase Assay (kit A-2218 from Molecular Probes) based on the evaluation of the catalase activity of the tested product on an hydrogen peroxide solution.

The specific Amplexred reagent reacts with H₂O₂, producing a component detected by fluorescence. The plant pigments were solubilized in ethanol in a range of concentration from 0,1 µg/ml to 10µg/ml. Butylated hydroxyanisole (or BHA) used as positive control was solubilized at 50µM and 500µM. A negative control was made with vehicle (ethanol) to check the absence of ●●●

Fig. 2. Compositions des fards à paupières avec T.A.P.E. et oxyde de fer/Eye shadow compositions with T.A.P.E. and iron oxide

Composition	Eye shadow T.A.P.E.	Eye shadow Control
Mineral fillers	79,80	79,80
Preservatives	0,2	0,2
T.A.P.E. Cosmos	4	
T.A.P.E. Pernambouc	4	
T.A.P.E. Quebracho	4	
Iron oxide		12
Binder	8	8

●●● Pour cet essai, les T.A.P.E. ont été dispersés dans l'huile de carnation aux concentrations suivantes, Cosmos (25 %, 5 % et 1 %), Pernambouc et Quebracho (50 %, 10 % et 2 %). Chaque dispersion est appliquée à la surface des explants de peau à raison de 5 mg/cm².

Pour l'essai concernant les fards à paupières, ces derniers sont appliqués purs, à raison de 5 mg/cm². Les explants témoins n'ont subi aucun traitement. Les explants traités et témoins maintenus en survie sont placés pendant 24 heures en incubateur. Après incubation et lavage, les explants sont exposés à une irradiation UVA/UVB (14 J/cm²/1 J/cm²) puis mis en incubation à nouveau pendant 24 heures. L'épiderme est ensuite séparé et la viabilité des cellules est évaluée par révélation au MTT. Les lipides épidermiques sont extraits par un mélange chloroforme/méthanol (2/1,v/v) pour doser la peroxydation lipidique à l'aide d'un kit spécifique (Peroxi-Detect Sigma PD1). Les résultats sont exprimés en pourcentage de peroxydes présents par volume d'échantillon. Celui-ci est inversement proportionnel à l'activité antiradicalaire.

Résultats

◆ **Pouvoir antiradicalaire des pigments végétaux**

Les trois extraits testés entre 0,1 et 10 µg/l ont diminué le pourcentage de fluorescence par rapport au témoin, selon un effet dose-dépendant. L'extrait de Cosmos présente une activité anti-radicalaire aux doses de 1 µg/ml et 10 µg/ml. Pour les trois doses testées, les extraits de Quebracho et Pernambouc présentent un pouvoir antiradicalaire comparable et supérieur à celui de l'extrait de Cosmos (figure 3).

◆ **Caractérisation couleur des pigments végétaux**

La longueur d'onde mesurée par absorption UV pour chacun des extraits est indiquée en figure 4.

◆ **Pouvoir antiradicalaire des T.A.P.E.**

L'irradiation UV, aux doses utilisées, a entraîné une augmentation significative du pourcentage de peroxydation lipidique sans modification de viabilité des explants (figure 5). Le véhicule utilisé pour la solubilisation des produits n'a pas interféré avec le dosage.

Le traitement des explants de peau par les T.A.P.E. a fortement diminué la production de peroxydes lipidiques après irradiation.

Le T.A.P.E. Cosmos diminue significativement le pourcentage de peroxydation lipidique aux doses de 5 % et 1 %. Aucun effet antiradicalaire n'est mesuré à 25 % de T.A.P.E. Cosmos.

Le T.A.P.E. Pernambouc diminue significativement le pourcentage de peroxydation lipidique à toutes les concentrations ●●●

●●● interference with the dosage. The percentage of fluorescence intensity measured is inversely proportional to the free radical scavenging activity.

◆ **Antioxidant properties of T.A.P.E., pure or included in eye-shadows**

The antioxidant assays of T.A.P.E. and eye-shadows were carried out using *ex-vivo* lipid peroxidation experiment, on skin explants. This method allows the topical evaluation of insoluble material (extracts or products), on survival skin explants. A previous cytotoxicity assay using an MTT test (3-(4-5-dimethylthiazol)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) was

conducted to determine the concentrations to be tested. For this trial, the T.A.P.E. were dispersed in carnation oil at the concentration below, Cosmos (25%, 5% et 1%), Pernambouc et Quebracho (50%, 10% et 2%). Each dispersion was applied on the surface of the skin explants at 5mg/cm².

The eye-shadows were applied directly at 5mg/cm². Control skin explants were not treated. The control and treated survival skin explants were incubated for 24h. After incubation and washing, the skin explants were exposed to UVA/UVB irradiation (14J/cm²/1J/cm²) then incubated again during 24h. Then the epidermis was separated and the cells viability was determined using MTT test. The epidermal lipids were extracted with a chloroform/methanol (2/1,v/v) mixture and measurement of lipid peroxidation was done using with a specific kit (PeroxiDetect Sigma PD1). The results are given in percentage of peroxides by volume of sample. This percentage is inversely proportional to the anti free radical activity.

Fig. 3 – Activité anti-radicalaire des extraits solubles/ Anti-radical activity of soluble extracts

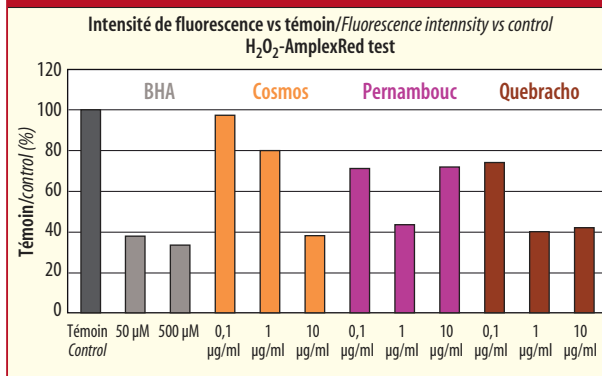
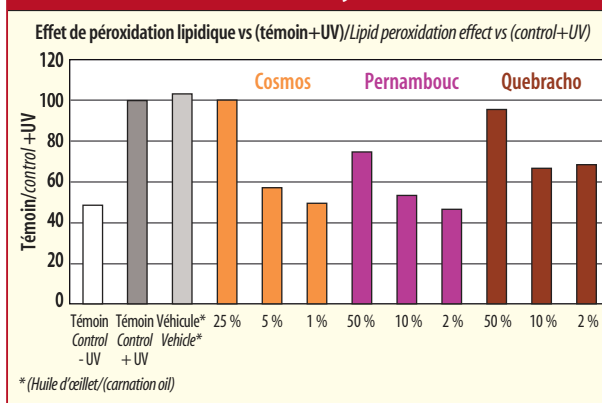


Fig. 4 – Longueurs d'onde des extraits solubles et couleurs associées / Wave length of soluble extracts and expected associated colours

Extraits solubles / Soluble plant extracts	λ. max (nm)	Couleur finale attendue / Expected final colour
Cosmos	430	Orange
Pernambouc	500	Rouge
Quebracho	400 à/to 600	Rouge foncé

Fig. 5 – Activité anti-radicalaire des T.A.P.E./ Antiradical activity of T.A.P.E.



Results

◆ **Anti free radical power of plant pigments**

The three extracts tested between 0,1 and 10µg/l decreased the percentage of fluorescence compared to the control, with a dose-dependent effect. The extract of Cosmos showed a free radical scavenging activity at the concentration of 1 µg/ml and 10µg/ml. The extracts of ●●●

●●● testées. Une réduction de 50 % de peroxydes est mesurée à la concentration de 2 %. Le T.A.P.E. Quebracho, testé à 2 % et 10 %, diminue significativement le pourcentage de peroxydes et aucun effet antiradicalaire n'est mesuré à 50 % de T.A.P.E. Quebracho.

◆ **Pouvoir antiradicalaire des T.A.P.E. inclus dans un fard à paupières**

Les résultats permettent de mettre en évidence un léger effet protecteur du fard à paupières témoin sur les explants traités par rapport aux explants non traités. L'application du fard à paupières T.A.P.E. apporte aux explants traités une protection totale permettant de revenir au niveau de peroxydation basale des explants non irradiés par les UV (figure 6).

◆ **Caractérisation couleur des T.A.P.E. purs et inclus dans un fard à paupières**

Les coordonnées colorimétriques L*a*b* des T.A.P.E. et du fard à paupières sont indiquées en figure 7 et figure 8.

●●● Quebracho and Brazil wood showed, at all concentrations, a level of activity higher than these measured for Cosmos. (Figure 3)

◆ **Colour characterization of plant pigments**

The wavelength measured by UV absorption is shown for each extract on Figure 4.

◆ **Antioxidant activity of T.A.P.E.**

The UV exposure, at the trial doses, triggered a significant increase of lipid peroxidation without any change in the cells viability (Figure 5). The vehicle used for T.A.P.E. dispersion did not interfere with the measurements.

The treatment of skin explants by T.A.P.E. strongly decreased the lipid peroxides production after UV-exposure. The Cosmos T.A.P.E. significantly decreased the percentage of lipid peroxidation at 5% and 1%. No effect was measured for Cosmos T.A.P.E. at 25%. The Brazil wood T.A.P.E. significantly decreased the percentage of lipid peroxidation at all the concentrations tested. A decreasing of 50% of peroxides is measured at 2% concentration. The Quebracho T.A.P.E. significantly decreased the percentage of lipid peroxidation at 2% and 10% and again no effect was measured for T.A.P.E. Quebracho at 50%.

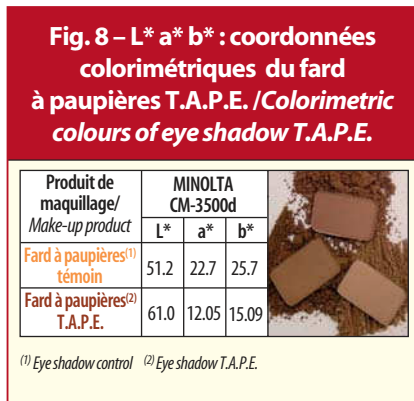
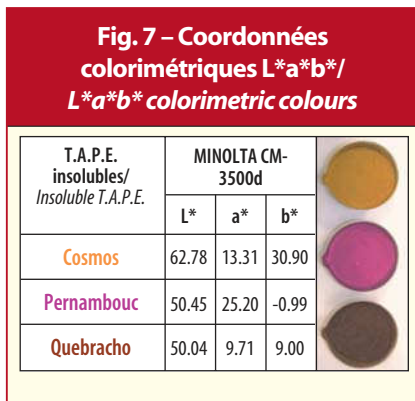
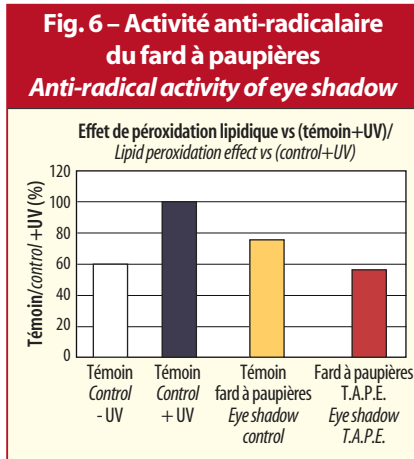
◆ **Antioxidant activity of T.A.P.E. included in an eye-shadow**

The results showed a weak protective effect of the control eye-shadow on treated skin explants versus untreated explants. The application of T.A.P.E. eye-shadow provided the skin explants with a complete protection helping them to recover the basal lipid peroxide level of

non irradiated skin explants. (Figure 6)

◆ **Colour characterization of T.A.P.E., pure or included in an eye-shadow**

The colour measurements L*a*b* of T.A.P.E. and eye-shadows are indicated on Figure 7 and Figure 8.



Discussion-conclusion

La stabilisation des pigments végétaux issus de bois exotiques et de fleurs a été réalisée sans perte des propriétés antioxydantes.

Le pouvoir antiradicalaire, ainsi que la couleur à laquelle il est intimement lié, ont été mis en évidence à chaque étape du processus de développement : pigments végétaux, T.A.P.E. et fard à paupières. Les T.A.P.E. constituent une nouvelle classe d'ingrédients actifs où l'activité antiradicalaire est véhiculée par la couleur. Les T.A.P.E. sont particulièrement adaptés à la formulation de cosmétiques de couleur tels que les fards à paupières mais aussi les rouges à lèvres (résultats non montrés).

Cette technique innovante permet de renforcer la performance des produits cosmétiques. De par les technologies mises en œuvre et parce qu'ils sont issus de sources renouvelables, la mise au point des T.A.P.E. constitue une innovation qui s'inscrit dans une démarche de respect et de protection de l'environnement.

Références

¹. Bruneton J. (1999) "Pharmacognosie : Phytochimie des plantes médicinales." Lavoisier Tec & Doc Paris – 3^e édition.
². Cardon D. (2003) "Le monde des teintures naturelles." Édition Belin
³. Miller Alan L. (1996) "Antioxidant Flavonoids : Structure, Function and Clinical Usage." Alternative Medicine Review, vol. 1, N° 2, 103-111.