

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 901 975**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64	(2006.01) A61P 17/00	(2006.01)
A61K 8/97	(2007.01) A61K 8/98	(2006.01)
A61K 8/36	(2006.01)	
A61K 8/30	(2006.01)	
A61Q 19/00	(2006.01)	
A61K 8/63	(2006.01)	
A61K 8/66	(2006.01)	
A61Q 19/08	(2006.01)	
A61K 8/92	(2006.01)	
A61K 35/60	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2013** **E 16174122 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.10.2021** **EP 3100717**

54 Título: **Cosmético que contiene un aislado proteico de desove de peces**

30 Prioridad:

23.01.2012 US 201261589592 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2022

73 Titular/es:

RESTORSEA, LLC (100.0%)
9990 Richmond Ave, Suite 370N
Houston, TX 77042, US

72 Inventor/es:

ALABATA, ENRIQUE y
PAO, PATRICIA, S.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 901 975 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

Cosmético que contiene un aislado proteico de desove de peces

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a un cosmético y a componentes del mismo, y en particular, a un cosmético que contiene extractos proteicos de eclosión de huevos y formulaciones de los mismos que son útiles para potenciar la calidad de la piel.

10

Antecedentes de la invención

Las formulaciones cosméticas tradicionales han incluido aceites y diversas sustancias lipófilas que formulan una capa protectora en la piel para mitigar los efectos de desgaste. La inclusión de un bloqueador solar en un cosmético mitiga igualmente el daño de los rayos ultravioleta a la piel asociado con el envejecimiento y la producción de radicales libres. Otros componentes convencionales respecto a las composiciones cosméticas son emolientes que transmiten cantidades apreciables de agua a la piel que, en combinación con aceites, afecta a la cantidad de humedad liberada o retenida de la piel para ocultar las arrugas. Desafortunadamente, dichas formulaciones cosméticas convencionales han fracasado en permitir una mejora química a largo plazo de la calidad de la piel.

20

La observación de trabajadores de un criadero de peces cuyas manos tenían una calidad de piel excepcional, incluso con una exposición prolongada al agua fría, era la génesis del aislamiento de una nueva clase de proteínas asociadas con huevos de peces. Dichas proteínas se detallan, por ejemplo, en los documentos US 6.346.245; 6.592.866; US 2011/0280882; WO2011/06434; y US 2009/0274770. Las proteínas así aisladas incluían zonasas, leucolectinas, proteínas muy ácidas (PMAs) y coraelisinas. Al menos algunas de estas proteínas son eficaces en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios e inflamatorios, así como piel dañada, todas con efectos secundarios mínimos. Si bien este tipo de proteínas mejora la función de la piel dañada asociada al desgaste y a diversos factores estresantes ambientales, tal como la exposición al aire acondicionado o a contaminantes atmosféricos, estas proteínas parecen tener un efecto escaso o nulo en otros atributos asociados a la piel dañada y envejecida. Adicionalmente, pese a haber contemplado la inclusión de dicho aislado proteico de desove de peces en cosméticos, la capacidad para mantener la actividad proteica y permitir la estabilidad durante el almacenamiento de una formulación cosmética representa un desafío técnico.

25

30

35

Por consiguiente, es preciso un cosmético estable durante el almacenamiento que trate múltiples aspectos del envejecimiento de la piel al tiempo que se incorporan los atributos antiinflamatorios de los huevos y, en particular, proteínas derivadas del desove de peces. Existe además una necesidad de un cosmético que esté prácticamente exento de componentes cosméticos sintéticos que posean efectos perjudiciales no deseados en los problemas de piel y de bioacumulación.

40

Sumario de la invención

Se proporciona una composición que incluye un aislado proteico de desove de peces que tiene un efecto antiinflamatorio sobre la piel de mamíferos. Se presenta igualmente un extracto de producto natural que incluye ácidos grasos insaturados y esteroides. El extracto de producto natural tiene una actividad antioxidante. Se proporciona un emulsionante o un solubilizante, o una combinación de los mismos para formar una mezcla del aislado y el extracto. Se proporciona asimismo una composición que incluye un aislado proteico de eclosión de huevos que tiene un efecto antiinflamatorio sobre la piel de mamíferos. Al menos un biocida protector de la actividad del aislado proteico de eclosión de huevos durante un almacenamiento de 3 meses a 20 °C está presente mientras la actividad aplicada a la piel del sujeto tras el almacenamiento se mantenga dentro del 80 % de una proteína no formulada y recién aislada. Un emulsionante forma una mezcla con el aislado proteico de eclosión de huevos que tiene una fase acuosa tamponada a un pH de entre 5,6 y 7,9. Se proporciona un kit inclusivo de una composición antes mencionada en un envase de uso múltiple no estéril junto con instrucciones para la aplicación del mismo a la piel para favorecer el rejuvenecimiento de la piel.

45

50

55

Un proceso de producción de un cosmético inclusivo de un aislado proteico de eclosión de huevos que tiene una actividad en la piel de un mamífero incluye la formación de al menos una fase acuosa y al menos una fase hidrófoba. Un emulsionante y al menos un biocida están presentes en al menos una fase acuosa y al menos una fase hidrófoba. Al menos una fase acuosa y al menos una fase hidrófoba se combinan para formar una emulsión. La emulsión o al menos una fase acuosa se tampona a un pH de entre 5,5 y 7,9 antes de la adición del aislado proteico de eclosión de huevos a la emulsión.

60

Se proporciona un proceso de mejora del aspecto de la piel que incluye la aplicación de la composición a la piel de un mamífero a un nivel de entre 1×10^{-6} a 0,1 mg del aislado y 2×10^{-7} a 0,02 mg de los ácidos grasos insaturados por cm cuadrado de piel al menos tres veces por semana para conseguir la mejora del aspecto de la piel.

65

Descripción de la invención

La presente invención tiene utilidad como cosmético con atributos restauradores cutáneos. En una realización, un cosmético de la invención se formula para otorgar un efecto sinérgico entre los diversos componentes. En otra realización, se formula una composición cosmética de la invención sin componentes sintéticos. Un cosmético de la invención en todas las realizaciones mantiene la actividad de los componentes proteicos mientras tenga una estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente y en respuesta a la exposición microbiana a través del procesamiento no estéril y la contaminación microbiana por la utilización del sujeto. Se proporciona un proceso de formulación que otorga una formulación cosmética con estos atributos de actividad proteica mantenida y estabilidad durante el almacenamiento en las condiciones de utilización y almacenamiento del cosmético.

De acuerdo con la presente invención, las proteínas activas de eclosión de huevos y, en particular, la proteína aislada del desove de peces que tiene un efecto antiinflamatorio sobre la piel de mamíferos vivos se combina con un extracto de producto natural que incluye ácidos grasos insaturados y al menos un esteroide. El extracto tiene simultáneamente actividad antioxidante y actividad de inhibición de la colagenasa, y se combina con un emulsionante que estabiliza la mezcla que incluye el aislado proteico y el extracto. Se puede apreciar que múltiples extractos se utilizan opcionalmente de forma simultánea en el presente documento para conseguir los requisitos composicionales y de actividad. Sorprendentemente, se ha descubierto que la actividad de proteínas de eclosión de huevos, y, en particular, la proteína de desove de peces y el extracto de producto natural funcionan sinérgicamente en algunas realizaciones de la invención para conseguir un aspecto superior para la piel y, en algunas realizaciones, el rejuvenecimiento de la piel, en comparación con cualquiera de los ingredientes utilizados solos en una formulación controlada. En aún otras realizaciones, se proporciona la estabilidad durante el almacenamiento de un cosmético de la invención de al menos 3 meses a 20 °C, mientras la actividad del componente proteico aplicado a la piel del sujeto tras el almacenamiento se mantenga dentro del 80 % de una proteína no formulada y recién aislada.

Un aislado proteico de desove de peces incluye, por ejemplo, una zonasa, una leucolectina, o una combinación de las mismas, y se han detallado las propiedades en los documentos US 6.346.245, col. 4, línea 15, col. 5, línea 8; US 2009/0274770 A1 [0321]-[0326] y US 2011/0280882 [0157]-[0194]; los extractos crudos que contienen tales proteínas; y sus combinaciones. Fuentes a modo de ejemplo del desove de peces para el aislamiento proteico incluyen huevos de esturión, salmón, pescado blanco, corégono, bacalao, capelán, y lota. Se puede apreciar que otras fuentes de proteínas de huevo claves en el presente documento incluyen los casos de huevo de anfibios; tales como los de los renacuajos y salamandras; casos de huevo de reptil, y casos de huevos de aves de corral. Normalmente, un huevo o, con particularidad, un aislado proteico de desove de peces que contiene al menos algunas de las proteínas previamente citadas constituye de 0,0001 a 10 % en peso total de una formulación cosmética de la invención siendo 0,01 a 10 por ciento del extracto proteína activa. Se puede apreciar que la cantidad de proteína presente en un cosmético de la invención depende de factores que incluyen, de manera ilustrativa, la miscibilidad con otros componentes de otro cosmético, y el grado de daño cutáneo.

Queda entendido que en las ocasiones en las que se proporcionan un intervalo de valores, el intervalo tiene por objeto abarcar no solo los valores del criterio de valoración del intervalo, sino también los valores intermedios del intervalo que se incluyen explícitamente en el intervalo y varían por la última cifra significativa del intervalo. A modo de ejemplo, un intervalo enumerado de 1 a 4 tiene por objeto incluir 1-2, 1-3, 2-4, 3-4, y 1-4.

Una composición de la invención contiene igualmente un extracto de producto natural. El extracto de producto natural incluye un ácido graso insaturado y un esteroide en una cantidad para que se proporcione una actividad antioxidante y una actividad de inhibición de la colagenasa superior al 10 % en relación con el control, medidas por un ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (CARO), y el trazador de lipoperoxidación en un medio de cultivo con un extracto de producto natural presente al 1 % y radiado con rayos ultravioleta B en una cantidad de 150 milijulios por centímetro cuadrado, respectivamente. R. L. Prior, *et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and other Biological and Food Samples. J. Agric. Food Chem.* (2003) 51:3273-3279. Se puede apreciar que los extractos naturales contienen a menudo mezclas de ácidos grasos insaturados, uno o más esteroides, y otros componentes de diferente actividad dermatológica. Un extracto de producto utilizado en una composición de la invención también inhibe la actividad de la colagenasa en algunas realizaciones en más de un 5 % en algunas realizaciones, medida por comparación con un control para un 0,1 % en peso de extracto en el control a través de un protocolo de medición visual del ensayo anticolagenasa en biopsias humanas con criocortes cutáneos incubados 30 minutos a 37 °C con, y sin un extracto seguido de tres horas de incubación a 37 °C sin (control negativo) o con 15 microlitros por mililitro de colagenasa, seguido de lavado de las muestras de biopsia, seguido de la coloración y microscopía para la medición visual de tricoma de Masson. En algunas realizaciones, un extracto de producto natural utilizado en una composición de la invención incluye al menos uno de un ácido graso omega 3, omega 6 y omega 9. En aún otras realizaciones, los ácidos grasos insaturados están presentes en el extracto de producto natural en una cantidad de al menos 20 miligramos por 100 gramos de extracto. Un extracto de producto natural de la invención también incluye al menos un tipo de esteroide, el esteroide incluye, de manera ilustrativa, colesterol, campesterol, estigmasterol, sitosterol, formas hidroxiladas de los mismos, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, al menos un esteroide está presente en un extracto de producto natural en una cantidad mayor a 50 miligramos por 100 gramos de extracto. Normalmente, un extracto de producto natural está presente en la composición de la invención de 0,01 a 10 por

ciento en peso total, y en algunas realizaciones de 0,1 a 3 por ciento en peso total. Los factores determinantes en la selección de la cantidad de extracto de producto natural incluyen, de manera ilustrativa, la estabilización de proteínas y glucósidos de eclosión de huevos cosméticos en presencia de proteínas de eclosión de huevos, grado del daño cutáneo, y vida media del cosmético.

Un extracto de producto natural, de acuerdo con la presente invención, se forma con facilidad por medio de técnicas convencionales, tales como la extracción de una porción de una planta, tal como hojas, tallos, brotes, raíces, frutos, o combinaciones de los mismos con un primer disolvente que es hidrófilo o hidrófobo, y la filtración de la mezcla después de estar en contacto con el disolvente durante periodos de entre 1 a 48 horas, siendo la cantidad de disolvente comprendida normalmente entre 1 y 20 volúmenes en relación con la del material vegetal. La extracción en los disolventes al disminuir la hidrofilia, y la elución mediante técnicas convencionales, permiten producir un extracto de producto natural de la invención. Técnicas de extracción de ácidos grasos/esterol representativas se hallan en J. S. O'Brien y A. A. Benson, *J. Lipid Res.*, 5, 1964, págs. 432-436. El disolvente orgánico incluye, de forma ilustrativa, éteres, furanos, destilados de petróleo, alcanos, alcanos halogenados, alcoholes, acetatos, y combinaciones de los mismos. Después de una interacción suficiente entre las fases, de normalmente entre 20 minutos y 48 horas, la fase orgánica se aísla para obtener un extracto de acuerdo con la presente invención. Fuentes adecuadas de extractos incluyen algas rojas, verdes, marrones, y cianobacterias con crecimiento en forma de césped denominadas colectivamente en el presente documento como "algas marinas", y plantas o componentes de las mismas tienen frutos de color púrpura, rojo, negro o naranja o coloraciones de la hoja, en las que la coloración de la hoja se mide en presencia o ausencia de clorofila. Las algas marinas representan una fuente común de extractos de producto natural de la invención con niveles elevados de ácidos grasos insaturados y esteroides. Se puede apreciar que las fuentes sintéticas y/o animales de ácidos grasos insaturados y esteroides se utilizan con facilidad en una composición de la invención.

Además del aislado proteico de eclosión de huevos y el extracto de producto natural, la composición de la invención, en algunas realizaciones, incluye uno o varios componentes empleados habitualmente en cosméticos con la condición de que estos componentes mantengan los atributos del aislado proteico de eclosión de huevos y se mantenga el extracto de producto natural. Representativo de los componentes cosméticos convencionales que se formulan con facilidad más adelante, estos incluyen, de manera ilustrativa, agua desionizada que constituye opcionalmente la mayor parte en peso del cosmético de la invención; sólidos y ceras, tales como petróleo, lanolina, ceresina, cera microcristalina, cera de carnauba, ácidos grasos C₁₀-C₃₀, alcoholes C₁₀-C₃₀; aceites, tales como aceite de oliva, aceite de jojoba, aceite de ricino, aceite de girasol, aceite de avellana, manteca de karité, y aceite de cártamo; modificadores de la viscosidad/estabilizantes, tales como goma guar, goma xantana, carragenano, hidroxietilcelulosa, goma de esclerocio, carbómeros, poliacrilatos, y copolímeros de alquil acrilato C₁₀-C₃₀-acrilato; humectantes hidrófilos, tales como glicerina, propanodiol, lactato de sodio, PCA de sodio; emolientes, tales como éter dicaprílico, miristato de miristilo, capratos C₁₀-C₃₀, triglicéridos C₁₀-C₃₀ que contienen ácidos caprílico y/o cáprico, y glicéridos C₁₀-C₃₀; coemulsionantes, tales como alcohol cetílico, alcohol estearílico, estearato de glicerilo, ácido esteárico, estearato de glicol, y diestearato de glicerilo; emulsionantes, tales como tensioactivos no iónicos y tensioactivos aniónicos, que incluyen, de manera ilustrativa, sales de lactilato de lauroilo, lactilato de caproilo, lactilato de cocoilo, lactilato de estearoilo, olivato de cetearilo, olivato de sorbitán, citrato de gliceril-oleato, en el que cationes típicos incluyen sodio, potasio, amonio, calcio, y magnesio; aceites de silicona; colorantes, tales como complementos inorgánicos y tintes inorgánicos; pigmentos inorgánicos u orgánicos y tintes orgánicos tratados con jabón metálico o tratados con silicio; tensioactivos no iónicos, polisiloxanos; conservantes en agua; modificadores del pH; vitaminas y metabolitos de vitamina, como vitamina E, vitamina K, o los complejos de la vitamina B; aceites esenciales; compuestos absorbentes de luz ultravioleta; fragancias; agentes humectantes; agentes potenciadores de la corriente sanguínea; agentes inductores de una sensación de frío; antitranspirantes; activos, y biocidas.

Como se utiliza en el presente documento, se define un activo como compuesto orgánico aplicado a la piel humana para su limpieza, embellecimiento, fomentar su atractivo, o alterar el aspecto que tiene eficacia en la mejora de los atributos de la piel independientemente de si el compuesto es de naturaleza polar o no polar. Como se utiliza en el presente documento, este término excluye concretamente una proteína de eclosión de huevos, una mezcla de proteínas de eclosión de huevos, y el extracto de producto natural. Compuestos orgánicos activos claves en el presente documento incluyen, de manera ilustrativa, extractos adicionales, tales como los del hongo *mpo Songyi*, *Acacia farnesiana*, *Euterpe oleracea*, *Malpighia glabra*, *Bixa orellana*, *Prunus dulcis*, *Aloe vera*, *Rhododendron ferrugineum*, *Amaranthus caudatus*, *Angelica archangelica*, *Pimpinella anisum*, *Malus domestica*, *Mentha suaveolens*, avenantramida de avena, *Prunus armeniaca*, *Arnika montana*, *Cynara scolymus*, *Asparagus officinalis*, *Persea americana*, *Cardiospermum halicacabum*, *Melissa officinalis*, *Bambusa vulgaris*, *Musa paradisiaca*, *Adansonia digitata*, *Berberis vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Laurus nobilis*, *Epilobium angustifolium*, *Allium ursinum*, *Geum urbanum*, *Betula pubescens*, *Quassia amara*, *Nigella sativa*, *Ribes nigrum*, *Morus nigra*, *Raphanus sativus*, *Camellia sinensis*, *Rubus fruticosus*, *Iris versicolor*, *Vaccinium myrtillus*, *Borago officinalis*, *Vicia faba*, *Menyanthes trifoliata*, *Fagopyrum esculentum*, *Arctium lappa*, *Ruscus aculeatus*, *Theobroma cacao*, *Acorus calamus*, *Carum carvi*, *Elattaria cardamomum*, *Daucus carota sativus*, *Erythroxylum catuaba*, *Centaurium erythraea*, *Matricaria chamomilla*, *Prunus cerasus*, *Cicer arietinum*, *Chlorella vulgaris*, *Aronia melanocarpa*, *Cinchona pubescens*, *Cinnamomum verum*, *Syzygium aromaticum*, *Cocos nucifera*, *Coffea arabica*, *Plectranthus barbatus*, *Tussilago farfara*, *Symphytum officinale*, *Plantago major*, *Coriandrum sativum*, *Zea mays*, *Papaver rhoeas*, *Centaurea cyanus*, *Gossypium herbaceum*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Primula veris*, *Vaccinium macrocarpon*, *Cucumis sativus*, *Curcuma*

longa, Bellis perennis, Rosa damascena, Turnera diffusa, Taraxacum officinale, Phoenix dactylifera, Lamium album, Rosa canina, Hylocereus undatus, Daemonorops Draco, Echinacea angustifolia, Leontopodium alpinum, Sambucus nigra, Acanthopanax senticosus, Phyllanthus emblica, Eucalyptus globulus, Oenothera biennis, Helichrysum arenarium, Euphrasia rostkoviana, Trigonella foenum-graecum, Ficus carica, Linum usitatissimum, Plumeria alba, Fumaria officinalis, Rumex acetosa, Gardenia Yessminoides, Gentiana lutea, Zingiber officinale, Ginkgo biloba, Panax ginseng, Solidago virgaurea, Vitis vinifera, Citrus paradisi, Camellia sinensis, Paullinia cupana, Graminis flos, Corylus avellana, Lawsonia inermis, Hibiscus sabdariffa, Lonicera japonica, Humulus lupulus, Aesculus hippocastanum, Equisetum arvense, Sempervivum tectorum, Hyssopus officinalis, Cetraria islandica, Baptisia tinctoria, Chondrus crispus, Hedera helix, Jasminum officinale, Simmondsia chinensis, Juniperus communis, Anthyllis vulneraria, Kigelia africana, Actinidia chinensis, Pueraria lobata, Alchemilla vulgaris, Lavandula angustifolia, Citrus limon, Cymbopogon cytratus, Glycyrrhiza glabra, Lilium candidum, Citrus aurantifolia, Tilia cordata, Nelumbo nucifera, Macadamia ternifolia, Magnolia biondii, Berberis aquifolium, Malva sylvestris, Mangifera indica, Calendula officinalis, Castanea sativa, Althaea officinalis, Filipendula ulmaria, Cucumis melo, Silybum marianum, Panicum miliaceum, Colophospermum mopane, Sorbus aucuparia, Verbascum thapsus, Guazuma ulmifolia, Myrtus communis, Tropaeolum majus, Azadirachta indica, Urtica dioica, Ascophyllum nodosum, Myristica fragrans, Quercus robur, Laminaria digitata, Avena sativa, Usnea barbata, Olea europaea, Allium cepa, Citrus sinensis, Mentha citrata, Origanum vulgare, Viola tricolor, Carica papaya, Capsicum annuum, Petroselinum crispum, Passiflora incarnata, Prunus persica, Pyrus communis, Centella asiatica, Paeonia officinalis, Piper nigrum, Mentha piperita, Ananas comosus, Prunus domestica, Punica granatum, Pulmonaria officinalis, Cucurbita pepo, Cydonia oblonga, Rubus idaeus, Trifolium pratense, Oryza sativa, Aspalathus linearis, Rosa centifolia, Rosmarinus officinalis, Secale cereale, Salvia officinalis, Schisandra chinensis, Hippophae rhamnoides, Sesamum indicum, Capsella bursa pastoris, Albizia julibrissin, Artemisia abrotanum, Mentha spicata, Triticum aestivum, Spirulina platensis, Picea abies, Hypericum perforatum, Averrhoa carambola, Stevia rebaudiana, Fragaria ananassa, Helianthus annuus, Melilotus officinalis, Tanacetum cinerariifolium, Citrus reticulata, Thymus vulgaris, Salvadora persica, Valeriana officinalis, Vanilla planifolia, Verbena officinalis, Viola odorata, Juglans regia, Nasturtium officinale, Citrullus lanatus, Triticum aestivum, Camellia sinensis, Crataegus rhipidophylla, Thymus serpyllum, Salix alba, hamamelis virginia, Isatis tinctoria, Lycium barbarum, Artemisia absinthium, Achillea millefolium, Hymenaea courbaril, Cananga odorata, Tricholoma matsutake Singer, o combinaciones de los mismos. Se puede apreciar que dichos extractos también pueden poseer un grado de actividad antimicrobiana que, en ciertas realizaciones, potencia la eficacia del biocida. Se utilizan normalmente compuestos orgánicos activos en una formulación de la invención de 0 a 1 por ciento en peso total, y en algunas realizaciones, de hasta 5 por ciento en peso total. Pese a que estos activos tienden a ser más tolerantes en las condiciones de procesamiento de cosméticos convencionales y, en muchas ocasiones, son susceptibles a una inclusión en una fase acuosa o lipófila distinta de la proteína de eclosión de huevos y el extracto de producto natural, se debe apreciar que este tipo de compuestos orgánicos activos en algunas realizaciones se añaden posteriormente a la formación de la emulsión a través de una fase C u otra distinta a la emulsión.

Un cosmético de la invención se formula con facilidad en un cosmético a base de agua que incluye, de forma ilustrativa, un tónico, una niebla de pulverización, un suero, una crema, una mascarilla, un protector solar, un limpiador facial, una hidratante, una preparación para baño, una base líquida, un astringente, una preparación para el afeitado, un producto para el cuidado del cabello, y otros productos para el cuidado de la piel, o un medicamento tópico que incluye, de forma ilustrativa, un agente antiinflamatorio. En realizaciones particulares de la presente invención, se proporciona un cosmético que incluye un emulsionante a base de plantas, tal como un lactilato que está esencialmente exento de silicona, exento de aceite mineral, exento de vaselina, y exento de parabenos sintéticos. Un emulsionante "sustancialmente exento" de estos compuestos se define en el presente documento por tener menos de 10 por ciento en peso de emulsionante de estos compuestos en total. Una formulación de la invención se aplica con facilidad a la piel humana en las regiones que incluyen concretamente y de forma ilustrativa, el rostro en su conjunto; las regiones del rostro que rodean la boca, ojos, frente, sien, mejillas, o mentón; manos; pies; cuello; cuero cabelludo; codos; pecho; antebrazos; hombros; piernas; y combinaciones de los mismos.

Un cosmético de la invención presenta dificultades en la formulación para mantener la actividad de la proteína. En general, se observa que el calentamiento y la mezcla de alta tasa de corte; técnicas habituales para la formulación cosmética, tienden a desnaturalizar la proteína activa. Es más, las proteínas activas son propensas a la degradación microbiana, en especial, cuando un cosmético de la invención se procesa en condiciones no estériles y se almacena a una temperatura ambiente de 20 °C. La formulación de un cosmético de la invención requiere que la proteína de eclosión de huevos se exponga a un intervalo limitado de valores de pH, mezclas de corte, y calor durante el proceso de formulación con el fin de mantener la actividad de la proteína de eclosión de huevos presente en el mismo. Para mantener la actividad proteica de eclosión de huevos, un proceso de formulación cosmética incluye el tamponamiento de cualquier fase constituyente cosmética a un pH de entre 5,6 y 8 antes de la introducción de la proteína de eclosión de huevos a la fase. El tamponamiento se practica habitualmente en el campo e incluye la adición de un ácido, una base, una sal del ácido, o una combinación de los mismos para equilibrar una solución acuosa o fase acuosa de una emulsión a un pH deseado. Se puede apreciar que la medición del pH es rutinaria, se mide cuantitativamente mediante ajuste volumétrico o con electrodos potenciométricos, tales como los disponibles comercialmente en Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, EE. UU.); y se mide cualitativamente con los kits de papel de tornasol.

Aunque los valores de pH de un cosmético de la invención se ajustan entre 5,6 y 7,9 para el mantenimiento de la actividad proteica, estos inhiben parcialmente la degradación microbiana de las proteínas de eclosión de huevos, los biocidas están presentes en una formulación de la invención a fin de mantener la actividad proteica en respuesta a los organismos presentes durante la formulación, y en respuesta a la siembra continua del cosmético con varios microbios durante la utilización de un recipiente de múltiples dosis a través del contacto tópico y respiratorio del sujeto con un cosmético de la invención. Como resultado, una formulación cosmética de la invención en las formulaciones de uso múltiple y estable durante el almacenamiento incluye un biocida de amplio espectro o una combinación de biocidas. Un biocida de amplio espectro se define en el presente documento por tener una actividad contra las bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y hongos asociados a un sujeto humano sano. Biocidas claves en el presente documento incluyen, de manera ilustrativa, ácido benzoico, parabenos, ácido salicílico, ácido carbólico, ácido sórbico, alquil p-hidroxibenzoatos, p-clorometacresol, hexaclorofeno, cloruro de benzalconio, cloruro de clorhexidina, triclorocarbanilida, fenoxietanol, acilsarcosinas, glutatión, ácido málico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ascorbatos, aceites vegetales esenciales, proteínas mutacina, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones de la presente invención, solo están presentes biocidas de origen natural. Biocidas de origen natural incluyen, de manera ilustrativa, filtrados de fermentación, tales como los de *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*, y *Leuconostoc*; bisabolol; eucaliptol; timol; inositol; saponinas; y extracto natural de plantas, tales como madreselva japonesa (*Lonicera japonica*), yang-ti (*Rumex japonicus*), kushen (*Sophora flavescens*), candock, orégano silvestre, naranja, salvia, manífol, malva común, chuanxiong (*Cnidii officinale Makino*), gentiana verde japonesa (*Swertia japonica Makino*), bisabolol, tomillo, dan gui (*Angelica sinensis*), cáscara de naranja, abedul, cola de caballo menor, esponja vegetal, castaño de Indias, saxífraga trepadora (*Saxifraga stolonifera*), árnica, lirio, artemisa, peonía, aloe, gardenia, así como los detallados en M. M. Cowan, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), octubre de 1999, págs. 564-582, o combinaciones de los mismos. Dichos extractos se obtienen mediante procedimientos detallados en *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), octubre de 1999, páginas 573-574 y, a menudo, por el uso de un disolvente orgánico hidrófilo, tal como un alcohol C₁-C₈, alcoholes polihídricos, agua y alcoholes acuosos. En una realización de la invención específica, la madreselva japonesa, floretina (manzanas), galangina (*Helichrysum aureonitens*) se utilizan como biocidas de origen natural, cada uno solo o en combinación. Se puede apreciar que además de las propiedades biocidas, un extracto natural imparte a menudo una fragancia a un cosmético de la invención. Un biocida está presente en envases de uso múltiple de los cosméticos de la invención en realizaciones específicas de 0,1 a 5 por ciento en peso total. Se puede apreciar que las cantidades de los biocidas más allá del 5 por ciento en peso total se incluyen con facilidad, como se desee.

Un cosmético de la invención se encuentra en determinadas realizaciones con un pH tamponado a un valor de entre 5,6 y 7,9 y en aún otras realizaciones comprendido entre 6,5 y 6,8, mientras que, en aún otras realizaciones, se encuentra comprendido entre 6,8 y 7,3. Sin desear quedar ligado a teoría alguna particular, estos valores de pH facilitan la estabilización y la estabilidad durante el almacenamiento del extracto de huevo, tal como componentes del aislado de desove de peces, y del extracto de producto natural. La formulación de un cosmético de la invención se facilita por la preformulación de al menos dos componentes, incluyendo una emulsión de aceite en agua y una segunda fase de emulsión de agua en aceite o de silicona con fases adicionales opcionales, tales como, por ejemplo, una tercera fase que contiene el extracto de huevo activo, tal como el aislado de desove de peces y/o extracto de producto natural. Alternativamente, se puede apreciar que uno o ambos del aislado de eclosión de huevos o el extracto de producto natural se dispersan con facilidad, ya sea en la emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite, de agua en silicona o una formulación sérica. Se ha descubierto, sorprendentemente, que el tamponamiento del pH de diversas fases antes de la adición de la proteína activa de extracto de huevo es crítico en el establecimiento de la estabilidad durante el almacenamiento del cosmético resultante de la invención, así como la actividad proteica sobre la piel del sujeto.

Los componentes minoritarios de la fase de una emulsión de aceite en agua incluyen, de manera ilustrativa, aceites, ceras, ésteres, éteres, mantecas, glicéridos, o combinaciones de los mismos, como se ha detallado previamente. Los componentes mayoritarios de la fase de una emulsión de aceite en agua incluyen agua, sales acuosas, agentes humectantes, y varios materiales solubles en agua, como se ha detallado previamente. Un emulsionante de dicho sistema incluye tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, como se ha indicado previamente, y también incluyen lecitina, liposomas y oleosomas. Otros aditivos no esenciales se proporcionan con facilidad, como se ha detallado previamente, para incluir modificadores de la viscosidad, estabilizadores de emulsión, fragancias, y similares. En realizaciones específicas, la emulsión de aceite en agua tiene un valor de pH de 5,6 a 7,9. En determinadas realizaciones, la emulsión de aceite en agua tiene un valor de pH de 6,5 y 6,8.

La emulsión de agua en aceite o agua en silicona varía las cantidades relativas de los componentes minoritarios y mayoritarios de la fase y se basa preferentemente en tensioactivos no iónicos y derivados de silicona como emulsionantes. Modificadores de la viscosidad y/o estabilizadores de la emulsión incluyen, de manera ilustrativa, sales solubles en agua, gomas, ceras, y combinaciones de las mismas, como se ha detallado previamente. En realizaciones específicas, la fase interna es un pH ajustado a un valor de pH de 5,6 a 7,9. En determinadas realizaciones, el valor del pH de la fase interna es de 6,5 a 6,8. Se puede apreciar que varias vitaminas, tales como vitamina E, vitamina K, derivados de ácido ascórbico, tales como glucósidos de ácido ascórbico, se proporcionan con facilidad en una o ambas fases de emulsión antes mencionadas o se proporcionan como una tercera fase separada.

Un cosmético de la invención se forma con facilidad por una combinación de fases premezcladas como se ha detallado previamente o alternativamente, todos estos componentes se mezclan entre sí en una secuencia convencional a la técnica como una mezcla unificada. Se proporciona un proceso de mejora del aspecto de la piel que incluye la aplicación de una composición de la invención a la piel de un mamífero a un nivel de 1×10^{-6} a 0,1 mg del aislado y 2×10^{-7} a 0,02 mg de los ácidos grasos insaturados por centímetro cuadrado de piel durante al menos tres veces por semana para lograr la mejora del aspecto de la piel.

Un resumen de los intervalos típicos para los cosméticos de la invención se proporciona en las Tablas 1-3. Se debe apreciar que otras formulaciones de base convencionales se ajustan con facilidad como se detalla en el presente documento para estabilizar las proteínas de eclosión de huevos, solo o en combinación, con un extracto de producto natural que contiene ácidos grasos y esteroides. Se proporcionan diversas formulaciones de base convencionales claves en el presente documento para un cosmético en E. W. Flick, "Cosmetic and Toiletry Formulations", 2ª ed., vol. 8; 2001, Noyes Publications, Norwich, Nueva York, EE. UU. (ISBN 0-1855-1454-9).

Tabla 1. Intervalos típicos del cosmético de la invención en emulsión de aceite en agua, en los que los porcentajes son porcentajes en peso total. Se proporciona en el presente documento una versión en tres fases y cuatro fases.

Formulación en tres fases

Fase A-1	
Agua desionizada	Restante
Modificador de la viscosidad/estabilizador	0 a 5 %
Humectante hidrófilo	0 a 20 %
Aceite vegetal/manteca	1 a 20 %
Emoliente a base de vegetal	0 a 20 %
Coemulsificante	0 a 10 %
Emulsionante secundario	0 a 10 %
Emulsionante de lactilato	0,1 a 10 %
Ajustador del pH/tampón a pH 5,6 a 7,9*	0 a 5 %
Biocida	0,1 a 10 %
Fragancia	0 a 5 %
Compuestos orgánicos activos no polares	0 a 1 %

Fase B-1	
Agua desionizada	1 a 20 %
Activo (ácido L-ascórbico 2-glucósido)	0 a 10 %
Ácido cítrico	0 a 1 %
Dihidrato de citrato sódico	0 a 1 %
Hidróxido sódico (20 %) a pH 5,6 a 7,9	0 a 5 %
Compuestos orgánicos activos polares	0 a 1 %

Fase C-1	
Activo (proteína activa de eclosión de huevos al 0,034 %)	0,001 a 10
Activo (extracto de producto natural)	0,001 a 10

Formulación en cuatro fases

Fase A-2a	
Agua desionizada	Restante
Modificador de la viscosidad/estabilizador	0 a 5 %
Humectante hidrófilo	0 a 20 %
Ajustador del pH/tampón a pH 5,6 a 7,9*	0 a 5 %
Biocida**	0 a 10 %
Fragancia	0 a 5 %
Compuestos orgánicos activos polares	0 a 1 %

Fase A-2b	
Aceite vegetal/manteca	1 a 20 %
Emoliente a base de vegetal	0 a 20 %

Coemulsificante	0 a 10 %
Emulsionante secundario	0 a 10 %
Emulsionante de lactilato	0,1 a 10 %
Biocida**	0 a 5 %
Fragancia	0 a 5 %
Compuestos orgánicos activos no polares	0 a 1 %

Fase B-1	
Agua desionizada	1 a 20 %
Activo (ácido L-ascórbico 2-glucósido)	0 a 10 %
Ácido cítrico	0 a 1 %
Dihidrato de citrato sódico	0 a 1 %
Hidróxido sódico (20 %) a pH 5,6 a 7,9	0 a 5 %
Compuestos orgánicos activos polares	0 a 1 %

Fase C-1	
Activo (proteína activa al 0,034 %	0,001 a 10 %
Activo (extracto de producto natural)	0,001 a 10 %

*- El ajuste del pH puede realizarse, sin embargo, también después de la combinación de las fases A y B, antes de la adición de la fase C-1.

**- Se requiere una cierta cantidad de biocida, normalmente 0,1 a 5 por ciento en peso total en las formulaciones de uso múltiple no estériles.

Tabla 2. Intervalos típicos del cosmético de la invención en una emulsión de agua en silicona, en los que los porcentajes son en porcentaje en peso total.

5

Fase A	
Polisiloxano	1 a 20 %
Otra silicona	1 a 10 %
Emulsionante de silicona/tensioactivo	1 a 15 %
Emoliente (sin silicona)	1 a 10 %
Compuestos orgánicos activos no polares	0 a 1 %

Fase B	
Agua desionizada	Restante
Glicol	1 a 30 %
Sal de metal alcalino	0,2 a 2 %
Modificador de la viscosidad/estabilizador	0,1 a 3 %
Ajustador del pH	0 a 3 %
Biocida**	0 a 2 %
Compuesto orgánico activo polar	0 a 1 %

Fase C	
Activo (proteína activa al 0,034 %	0,001 a 10 %
Activo (extracto de producto natural)	0,001 a 10 %

Tabla 3. Intervalos típicos del cosmético de invención en una formulación sérica, en los que los porcentajes son en porcentaje en peso total.

10

Fase A	
Agua desionizada	Restante
Modificador de la viscosidad	0,1 a 2 %
Ajustador del pH	0,1 a 3 %
Glicol	0,01 a 10 %
Glicerina	0,01 a 10 %
Biocida	0,01 a 2 %
Compuesto orgánico activo polar	0 a 1 %

Fase B	
Solubilizante	0,1 a 10 %
Compuesto orgánico activo no polar	0 a 1 %

	Fase C	
Activo (proteína activa al 0,034 %		0,001 a 10 %
Activo (extracto de producto natural)		0,001 a 10 %

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes artículos:

Artículo 1. Un cosmético que comprende:

un aislado proteico de desove de peces que tiene un efecto antiinflamatorio sobre la piel de mamíferos;
un extracto de producto natural que comprende ácidos grasos insaturados y esteroides, dicho extracto de producto natural tiene una actividad antioxidante sobre la piel de mamíferos; y
un emulsionante o un solubilizante, o una combinación de los mismos, que forma una mezcla de dicho aislado y dicho extracto.

Artículo 2. El cosmético del artículo 1, en el que dicho aislado proteico de desove de peces está presente de 0,00001 a 10 por ciento en peso total.

Artículo 3. El cosmético del artículo 1, en el que dicho extracto de producto natural es un extracto vegetal.

Artículo 4. El cosmético del artículo 3, en el que dicho extracto vegetal es un alga marina.

Artículo 5. El cosmético del artículo 1, en el que dicho extracto de producto natural se obtiene de algas rojas, algas marrones o cianobacterias con crecimiento en forma de césped.

Artículo 6. El cosmético del artículo 1, en el que dichos ácidos grasos insaturados incluyen al menos uno de un ácido graso omega 3, omega 6 u omega 9.

Artículo 7. El cosmético del artículo 1, en el que dichos esteroides incluyen al menos uno de colesterol, campesterol, estigmasterol o sitosterol.

Artículo 8. El cosmético del artículo 1, que comprende además un ácido ascórbico o sal de ascorbato.

Artículo 9. El cosmético del artículo 1, que comprende además al menos un biocida.

Artículo 10. El cosmético del artículo 9, en el que al menos dicho biocida comprende un extracto vegetal, un filtrado de fermentación bacteriana, o una combinación de los mismos.

Artículo 11. El cosmético del artículo 9, en el que al menos dicho biocida comprende un extracto de madreleja japonesa en combinación con otro extracto vegetal para inhibir organismos encontrados en un sujeto humano sano, dichos organismos son bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, y hongos.

Artículo 12. El cosmético del artículo 1, en el que dicho aislado proteico de desove de peces, dicho extracto de producto natural, y dicho emulsionante están sustancialmente exentos de silicona, vaselina, parabeno sintético, y aceite mineral.

Artículo 13. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 1 a 12, en el que dicho aislado proteico de desove de peces comprende zonasa.

Artículo 14. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 1 a 12, en el que dicho aislado proteico de desove de peces consiste esencialmente en zonasa como proteína activa.

Artículo 15. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 1 a 12, en el que dicho aislado proteico de desove de peces comprende leucolectina.

Artículo 16. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 1 a 12, en el que dicho aislado proteico de desove de peces consiste concretamente en leucolectinas como proteínas activas.

Artículo 17. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 1 a 12, en el que dicho emulsionante consiste concretamente en componentes a base de planta.

Artículo 18. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 1 a 12, en el que dicha mezcla tiene una fase acuosa, dicha fase acuosa tiene un pH de entre 5,6 y 7,9.

Artículo 19. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 1 a 12, en el que dicho aislado proteico de desove de peces se obtiene de huevas de salmón.

Artículo 20. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 1 a 12, en el que dicho aislado proteico de desove de peces se obtiene de huevas de al menos uno de pescado blanco, corégono, bacalao, capelán y lota.

Artículo 21. Un cosmético que comprende:

un aislado proteico de eclosión de huevos que tiene un efecto antiinflamatorio sobre la piel de mamíferos; se proporciona al menos un biocida protector de la actividad de dicho aislado proteico de eclosión de huevos durante 3 meses de almacenamiento a 20 °C, mientras la actividad aplicada a la piel del sujeto tras el almacenamiento permanezca dentro del 80 % de proteína no formulada y recién aislada; y

un emulsionante o un solubilizante, o una combinación de los mismos que forman una mezcla de dicho aislado proteico de eclosión de huevos, dicha mezcla tiene una fase acuosa, tamponada a un pH de entre 5,6 y 7,9.

Artículo 22. El cosmético del artículo 21, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos se obtiene de al menos un caso de huevo de anfibio, un caso de huevo de reptil, un caso de aves de corral, o desove de peces.

Artículo 23. El cosmético del artículo 21, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos, al menos dicho biocida, y dicho emulsionante está sustancialmente exento de silicona, vaselina, parabeno sintético, y aceite mineral.

Artículo 24. El cosmético del artículo 21, en el que al menos dicho biocida consiste en extractos de plantas.

Artículo 25. El cosmético del artículo 21, en el que al menos dicho biocida comprende un extracto de madre selva japonesa en combinación con otro extracto vegetal para inhibir organismos encontrados en un sujeto humano sano, dichos organismos son bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, y hongos.

Artículo 26. El cosmético del artículo 21, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos está presente de 0,00001 a 1 por ciento en peso total.

Artículo 27. El cosmético del artículo 21, que comprende además un extracto de producto natural que incluye ácidos grasos insaturados y esteroides, dicho extracto tiene una actividad antioxidante sobre la piel de mamíferos.

Artículo 28. El cosmético del artículo 27, en el que dicho extracto se obtiene de algas rojas, algas marrones o cianobacterias con crecimiento en forma de césped.

Artículo 29. El cosmético del artículo 27, en el que dichos ácidos grasos insaturados incluyen al menos uno de un ácido graso omega 3, omega 6 u omega 9.

Artículo 30. El cosmético del artículo 27, en el que dichos esteroides incluyen al menos uno de colesterol, campesterol, estigmasterol o sitosterol.

Artículo 31. El cosmético del artículo 21, que comprende además un ácido ascórbico o sal de ascorbato.

Artículo 32. El cosmético del artículo 21, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos, al menos dicho biocida, y dicho emulsionante están sustancialmente exentos de silicona, vaselina, parabeno sintético, y aceite mineral.

Artículo 33. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 21 a 32, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos comprende zonasa.

Artículo 34. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 21 a 32, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos consiste concretamente en zonasa como proteína activa.

Artículo 35. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 21 a 32, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos comprende leucolectina.

Artículo 36. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 21 a 32, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos consiste concretamente en leucolectinas como proteínas activas.

Artículo 37. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 21 a 32, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos se obtiene de huevas de salmón.

Artículo 38. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 21 a 32, en el que dicho aislado proteico de eclosión de huevos se obtiene de huevos de al menos uno de pescado blanco, corégono, bacalao, capelán, y lota.

Artículo 39. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 21 a 32, en el que dicho pH se comprende entre 6,5 y 6,8.

Artículo 40. El cosmético de uno cualquiera de los artículos 21 a 32, en el que dicho pH se comprende entre 6,8 y 7,3.

Artículo 41. Un kit que comprende un cosmético de uno de los artículos 21 a 32 en un envase de uso múltiple no estéril junto con instrucciones para su aplicación a la piel para favorecer el rejuvenecimiento de la piel.

Artículo 42. Un proceso de producción de un cosmético del artículo 21, que comprende:

la formación de al menos una fase acuosa y al menos una fase hidrófoba, dicho emulsionante y al menos dicho biocida presentes en al menos una de dicha fase acuosa y al menos una de dicha fase hidrófoba; la combinación de al menos dicha fase acuosa y al menos dicha fase hidrófoba para formar una emulsión; el tamponamiento de dicha emulsión o al menos una de dicha fase acuosa a un pH de entre 5,5 y 7,9; y

la adición posterior de dicho aislado proteico de eclosión de huevos a dicha emulsión.

Artículo 43. El proceso del artículo 42, en el que dicho pH se comprende entre 6,5 y 6,8.

Artículo 44. El proceso del artículo 42, en el que dicho pH se comprende entre 6,8 y 7,3.

Artículo 45. El proceso del artículo 42, que comprende añadir además un extracto de producto natural a dicha emulsión, dicho extracto de producto natural comprende ácidos grasos insaturados y esteroides, dicho extracto de producto natural tiene una actividad antioxidante sobre la piel de mamíferos.

Artículo 46. El proceso del artículo 42, en el que dicha adición ocurre independientemente del calentamiento y de la mezcla de alta tasa de corte.

Artículo 47. Un proceso de mejora del aspecto de la piel, que comprende:

la aplicación a la piel de un mamífero de una composición de la reivindicación 1 a un nivel de 1×10^{-6} a 0,1 mg de dicho aislado proteico de desove de peces y 2×10^{-7} a 0,02 mg de dichos ácidos grasos insaturados por cm cuadrado de piel al menos tres veces por semana para lograr el rejuvenecimiento de la piel.

Artículo 48. El proceso del artículo 47, en el que la piel del mamífero es un rostro humano.

Artículo 49. El proceso del artículo 47, en el que la piel del mamífero es una de las regiones faciales de un ser humano como boca, ojos, frente, sien, mejillas, o mentón.

Artículo 50. El proceso del artículo 47, en el que la piel del mamífero es un cuero cabelludo humano.

La presente invención se ilustra adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Una crema cosmética se prepara después de la formulación de las tres fases. La fase A se calienta a 75-80 °C con mezcla suficiente para formar una mezcla homogénea. La fase B se mezcla previamente en un recipiente separado a temperatura ambiente y se añade a la fase A a 40 °C o a una temperatura inferior. La fase C se añade a la ahora mezcla de fases A y B combinadas en orden con la mezcla suficiente hasta que se forme una crema homogénea. Se tiene como resultado una crema homogénea y estable durante el almacenamiento.

EJEMPLO 2

Se proporciona una crema cosmética en la que el aislado proteico de desove de peces y un extracto de producto natural son componentes de la fase A en lugar del aislado proteico de desove de peces y el extracto de producto natural presentes en una fase C separada al Ejemplo 1. Con la formación de la fase A a temperatura ambiente para evitar la desnaturalización de las proteínas, se obtiene una crema similar.

EJEMPLOS COMPARATIVOS

Una composición comparativa al Ejemplo 1 se crea como una crema sin aislado proteico de desove de peces (ejemplo comparativo A). Otra composición está desprovista de un extracto de producto natural (ejemplo comparativo B). Asimismo, se produce una formulación de control que carece tanto de aislado proteico de desove de peces como de extracto de producto natural (ejemplo comparativo C). Un grupo de estudio de 40 individuos se

divide en cuatro grupos, cada grupo se aplica diariamente una crema del ejemplo 1 o una de los ejemplos comparativos A-C durante 12 semanas. Se mide el valor basal de la elasticidad de la piel para cada sujeto, y al final de la investigación sobre la normalización con respecto al control del ejemplo comparativo C, la composición del ejemplo 1 muestra una tersura y suavidad superiores relativas a los ejemplos comparativos A-C. Todas las composiciones se normalizan en un nivel de 1×10^{-6} mg del aislado (si está presente) y 2×10^{-7} mg de los ácidos grasos insaturados (si están presentes) por cm cuadrado de piel por aplicación.

EJEMPLO 3

Los huevos de salmón sin fertilizar, frescos (*Salmo salar*) recogidos de hembras en fase reproductiva (finales de otoño) se mantienen en hielo, y el extracto se fabricó de manera inmediatamente preferente. Es posible congelar huevos liofilizados en un crioprotector (por ejemplo, 1,2-propanodiol 1,5 M y sacarosa 0,2 M) sin alterar la membrana del huevo. La congelación debe ser gradual ($-1^\circ\text{C}/\text{min}$) a -80°C . Los huevos deben descongelarse y mantenerse en hielo durante todo el procedimiento de preparación del extracto.

Los huevos se lavan dos veces en SSEH o en agua de mar con inhibidores de la proteasa ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). La solución de lavado se elimina y los huevos se lisan y se homogenizan en un homogeneizador de vidrio-vidrio preenfriado Dounce. El lisado se transfiere a tubos de centrifugación de polímeros Beckman Ultra Clear (5 ml) evitando al mismo tiempo la transferencia de las cáscaras de huevo, y se centrifugó durante 15 min a 15.000 g a 4°C en una ultracentrifugadora Beckman utilizando un rotor SW55T1. De este modo, se obtienen tres fracciones; fracción lipídica superior, fracción media citoplasmática, y una fracción inferior que contiene cáscaras de huevo y desechos nucleicos. La fracción media citoplasmática es el extracto recogido. Se espera que este extracto que contiene muchos orgánulos citosólicos, incluyendo mitocondrias, lisosomas y peroxisomas, deba ser transparente y viscoso, y tener un tono anaranjado. Se añaden inhibidores de la proteasa ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ de solución madre) y los extractos se mantienen a -80°C . Se recogen embriones en fase blástula media de pez cebra, se elimina el líquido, y se congelan a -20°C . Para preparar el extracto, los embriones se descongelan en hielo, se lisan y se homogenizan por medio de un homogeneizador de vidrio-vidrio Dounce en una pequeña cantidad de SSEH o agua de mar (preferentemente menos de 50 % en v/v de líquido). El lisado se filtra a través de un tejido de lino estéril y se centrifuga a 5.000 g a 4°C durante 20 minutos en un rotor SX4250 utilizando una centrifugadora Beckman X-22R. El extracto citoplasmático (sobrenadante) se recoge y se añaden los inhibidores de la proteasa ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). El extracto puede ser un filtrado de Millipore (filtro estéril MilliQ de $0,22 \mu\text{m}$). Los extractos se mantienen a -80°C . El pH del extracto se mide por papel de tornasol, la concentración proteica se mide por el ensayo de Bradford, y la osmolaridad se mide por un osmómetro.

Este procedimiento general es útil para la preparación de extractos de erizo de mar, camarones, huevos/o huevas de peces o huevos de rana. En pocas palabras, las huevas se recogen de peces hembra preñadas poco después de liberar sus huevos en un programa de desove (hormona GCh inyectada ($1 \text{ ml}/\text{kg}$) a 6 a 8 horas antes de la liberación de sus huevos, por lo general, en la madrugada (2-4 AM), o de ranas preñadas. Las huevas/huevos se liofilizan o congelan a -20°C o se utilizan frescos. Las huevas se recogen de diferentes tipos de peces. Para el erizo de mar, se inyecta KCl $0,5 \text{ M}$ en torno a la boca para provocar el desprendimiento de los huevos. El extracto se prepara a partir de huevos/huevas por aplastamiento (rotura celular u homogeneización Dounce) o centrifugación a velocidades diferentes para separar el citoplasma con todo el contenido, con/sin cáscaras de huevo (zona pelúcida), con/sin núcleo/citosol, con/sin orgánulos, con/sin lípidos. El fraccionamiento adicional puede llevarse a cabo para aislar uno o más de ARNm, proteínas, péptidos pequeños, carbohidratos y lípidos. Los componentes principales de los ácidos grasos en las huevas son ácido oleico, ácido linoleico, y ácidos grasos omega 3.

Tras la aplicación del protocolo anterior para los extractos de huevos de salmón, los extractos de huevos de salmón tenían una concentración proteica sorprendentemente alta que varía de $100\text{-}380 \text{ mg}/\text{ml}$, pH entre 6,4-6,8, y una osmolaridad de aproximadamente 350 mOsm . Los extractos son transparentes, viscosos y no filtrables (por filtro de $0,45 \mu\text{m}$ de MilliQ). La proteína del extracto se precipita con facilidad tras la adición de agua o soluciones hidratadas con baja capacidad de tamponamiento debido al alto contenido en proteínas y bajo pH. Los extractos pueden neutralizarse a un pH 7,0 mediante la adición de alcalinos ($1\text{-}3 \mu\text{l}$ de NaOH $1 \text{ M}/\text{ml}$ extracto), después de lo cual, la dilución en agua y las soluciones hidratadas son posibles. Los extractos del pez cebra tenían una concentración de proteínas que variaba de $23 \text{ a } 26 \text{ mg}/\text{ml}$, pH entre 6,4 a 6,8, y una osmolaridad entre $80\text{-}150 \text{ mOsm}$. Los extractos son transparentes, no viscosos, filtrables y se diluyen en agua con facilidad en todas las diluciones.

EJEMPLO 4

Las zonasas de salmón purificadas por filtración en gel además de ser purificadas por afinidad pueden purificarse adicionalmente a una pureza de grado secuencial por medio de un procedimiento cromatográfico final. Este procedimiento emplea una columna PBE94, con un tampón de Tris-acetato (10 mM , pH 9,0), en el que la elución posterior se prepara con un gradiente de sal (hasta una sal de NaCl 1 M) en este tampón. Esta etapa aumenta en sí la actividad catalítica de las zonasas en un valor de 7,6 veces, para una purificación total de 714 veces y con un rendimiento del 28 % del material de partida. Esta etapa de purificación deja la identidad proteica de las zonasas intacta como un resto de 28 kDa . Por tanto, la etapa no elimina los contaminantes principales proteicos sin relación

de la preparación de zonasa. El peso molecular de zonasa purificada es idéntico al observado por la técnica de inmunoelectrotransferencia para los restos de zonasa presentes en el fluido de eclosión y en el "crudo de zonasa".

Lo que aparentemente tiene lugar en el tercer y último procedimiento cromatográfico es que se eliminan péptidos pequeños contaminantes. Estos péptidos parecen ser oligopéptidos con aproximadamente una docena de residuos, originados muy probablemente de las cáscaras de huevo y/o del embrión de salmón. Estos péptidos contaminantes parecen ejercer efectos inhibidores sobre la catálisis de zonasa, ya que su eliminación aumenta la actividad catalítica de la zonasa. Además, su presencia interfiere con las primeras etapas en la secuenciación de Edman de este producto de zonasa. Las dos formas de zonasa contempladas en esta tercera etapa de purificación se unen de manera algo diferente a la matriz de columna. No obstante, ambas formas tienen secuencias aminoácidas similares en sus porciones N-terminal.

Las secuencias aminoácidas parciales de péptidos generados por CNBr establecieron las zonasa como proteínas distintas. El análisis estructural indicó que las zonasa pueden tener distintos dominios catalíticos y de unión a sustrato, lo que puede explicar su sensibilidad a agentes quelantes de calcio cuando actúan sobre sustratos macromoleculares (fisiológico) (la unión se inhibe, por lo tanto, la catálisis se inhibe indirectamente), y también su sensibilidad a inhibidores de serina proteasa cuando actúan en sustratos pequeños (la catálisis se inhibe directamente).

EJEMPLO 5

Tanto la zonasa como la leucolectina se purifican de fluido de eclosión de salmón. Para mejorar la concentración proteica de fluido de eclosión, los huevos de salmón se transfieren a volúmenes mínimos de agua antes de la eclosión. La eclosión muy sincrona puede ser inducida por temperaturas elevadas (ambiente), o por desoxigenación (Oppen-Berntsen *et al.* 1990, *Aquaculture*, 86, págs. 417-430), que produce un pequeño volumen de preparación muy concentrada de zonasa cruda y proteínas asociadas.

La purificación inicial de la zonasa implicó la filtración de los huevos eclosionados de salmón a través de una estopilla. Este filtrado puede congelarse durante años sin degradación significativa de zonasa, antes de descongelarse y emplearse para la purificación adicional proteica. Este hecho simplifica, en gran medida, la producción de un material de partida para la purificación de zonasa de salmón y proteínas asociadas, incluyendo leucolectina.

La siguiente etapa, opcional, involucrada ajusta el filtrado de proteína a urea 4 M, para disociar fragmentos de la cáscara de huevo de salmón, lo que permitió su eliminación junto con los desechos extraños por centrifugación a baja velocidad (15.000 g; dos veces durante 15 min). Este material no mostró signos de obstrucción en las columnas, que es característico de materiales crudos preparados de modo diferente a lo que se ha descrito previamente. Esta preparación de proteína cruda es adecuada para la purificación por técnicas cromatográficas convencionales.

La leucolectina de fluido de eclosión puede aislarse junto con zonasa. A partir de preparaciones de zonasa parcialmente purificadas (como se ha descrito previamente), la leucolectina puede aislarse por cromatografía de exclusión cuando la zonasa en su forma nativa sea sustancialmente mayor que la leucolectina. Para una primera separación, se utilizan columnas Superdex 16/60, tras lo cual, la zonasa puede eliminarse mediante cromatografía de afinidad en columnas de benzamidina-sefarosa.

Para preparaciones a gran escala, el uso de ultrafiltración también es adecuado cuando la zonasa en su forma nativa no penetra significativamente en ultrafiltros con exclusión por tamaño de 100 kDa a diferencia de la leucolectina.

Los tampones utilizados son Tris milimolar (por ejemplo, 10 mM) con un pH aproximadamente neutro o ligeramente alcalino (pH 7,5-8,5), que contienen 5 mM de NaCl. Se descubre que la proteína leucolectina se copurifica con zonasa. El tamaño de esta nueva proteína, estimado por cromatografía en condiciones nativas, es de apenas 30 kDa.

El PM estimado de la lectina es de aproximadamente 25-30 kDa. El valor pI estimado para la lectina de salmón correspondiente es aproximadamente pH = 6,5. Los valores pIs observados (Riste, sin publicar) son de pH 6,5 a 6,9 en lectinas perivitelinas de salmón, y de pH 6,4 a 6,6 en lectinas leucocitarias de salmón (la lectina se identifica mediante técnicas de inmunoelectrotransferencia).

EJEMPLO 6

Un estudio para evaluar la seguridad y eficacia de los productos cosméticos en forma de una crema de día y una crema para el contorno de ojos utiliza las formulaciones desveladas previamente durante un periodo de estudio de 12 semanas. Un total de 40 sujetos de sexo femenino, con edades comprendidas entre 37 y 60 años, se seleccionaron para el estudio. Todas las 40 participantes completaron el estudio.

En las condiciones de este estudio, los materiales de ensayo identificados como la crema de día y la crema para el contorno de ojos, demostraron potencial para mejorar las líneas faciales finas, arrugas, hiperpigmentación, uniformidad del tono de la piel, luminosidad de la piel, laxitud de la piel, y aspereza táctil durante un periodo de uso de doce semanas. Además, los materiales de ensayo son bien tolerados y no demostraron el potencial para causar irritación cutánea significativa cuando se aplica al rostro.

Se observaron mejoras estadísticamente significativas en las puntuaciones de Packman y Gans para las líneas faciales superficiales del rostro, y en las puntuaciones de la escala visual analógica (EVA) para la hiperpigmentación facial, uniformidad del tono de la piel, luminosidad de la piel, laxitud de la piel, y aspereza táctil siguiendo dos, seis y doce semanas de aplicaciones dos veces al día. No se observan aumentos estadísticamente significativos en la irritación (eritema, edema, sequedad, escozor, ardor y sensación de tirantez/sequedad) desde el valor basal en cualquier intervalo post-tratamiento.

EJEMPLO 7

Se realiza un estudio para evaluar la eficacia de conservantes biocidas contra la contaminación microbiana en productos cosméticos en forma de una crema de día y crema para el contorno de ojos utilizando las formulaciones desveladas previamente durante dos periodos de estudio de 4 semanas. Los métodos empleados se hallan en las Directrices de Microbiología CPTP, sección 20, M-3, *A Method for Preservation Testing of Water Miscible Personal Care Products* y USP 34, sección 61, *Neutralization/Removal of Antimicrobial Activity*. Los organismos de ensayo incluyen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Para los productos de la categoría 2, el conservante se considera eficaz en la muestra examinada, si a), las concentraciones de bacterias viables demuestran como mínimo una reducción de 3,0 log (99,9 %) a partir del recuento inicial a los 7 días, y sin aumento durante la duración del periodo de ensayo, y b), la concentración de levaduras y mohos viables demuestra como mínimo una reducción de 1,0 log (90,0 %) a partir del recuento inicial a los 7 días, y sin aumento durante la duración del periodo de ensayo.

Los resultados del estudio mostraron que la crema de día y la crema para el contorno de ojos correspondían a los criterios de aceptación para los productos de la categoría 2.

EJEMPLO 8

Un estudio se lleva a cabo para determinar el potencial comedogénico de los materiales de ensayo en forma de crema de día y crema para el contorno de ojos con formulaciones desveladas previamente mediante la evaluación de si los materiales de ensayo provocaron microcomedones, tras cuatro semanas de aplicación reiterada en condiciones de parche oclusivo, en relación con un control negativo (parche no dosificado). El alcohol de lanolina acetilada sirvió como material de control positivo con el fin de validar el estudio. Los ensayos se llevan a cabo durante un periodo de estudio de 4 semanas. Un total de 15 sujetos, con edades comprendidas entre 22 a 45 años, se seleccionan para el estudio. Los 15 participantes completaron el estudio.

La evaluación de los especímenes de biopsia folicular recogidos de los sitios de ensayo indicó que los materiales de ensayo y control provocaron puntuaciones globales de evaluación promedias de 0,5 (1-24 % de masas rugosas pequeñas). La relación media de microcomedones por folículo es 1 % para los materiales de ensayo y el control negativo, y 6 % para el control positivo. No existen diferencias estadísticamente significativas en las relaciones de microcomedones a folículos entre los materiales de ensayo y el control negativo, pese a que el control positivo demostró una relación significativamente mayor que el control negativo.

El estudio mostró que no se describen experiencias adversas durante el periodo de estudio. Los materiales de ensayo no demostraron el potencial para provocar comedogenicidad. Las relaciones de microcomedones por folículo no son estadísticamente diferentes para los sitios tratados con cada uno de los materiales de ensayo y los sitios en los cuales se aplica un parche de control negativo sin tratar.

EJEMPLO 9

Se lleva a cabo un estudio para determinar la irritación cutánea y el potencial de sensibilización de un material de ensayo en forma de crema para el contorno de ojos con formulaciones desveladas previamente. Los ensayos se llevan a cabo durante un periodo de estudio de 8 semanas. Este estudio se inició con 225 sujetos. Once sujetos interrumpieron su participación en el estudio por razones no relacionadas con el material de ensayo. Un total de 214 sujetos completaron el estudio.

Los ensayos se llevan a cabo mediante la aplicación de parches con el material de ensayo a un área de ensayo limpiada con alcohol isopropílico al 70 %, y se deja secar. El material de ensayo se aplica en la parte superior de la espalda (entre la escápula) y se deja en contacto directo con la piel durante un periodo de 24 horas. Los parches se aplican en el mismo sitio el lunes, miércoles y viernes para un total de 9 aplicaciones durante el periodo de inducción. Este programa puede haber sido modificado para permitir visitas o vacaciones no realizadas. Si un sujeto

no está en condiciones de informar sobre la fecha de ensayo asignada, se aplica el material de ensayo en 2 días consecutivos durante la fase de inducción y/o un maquillaje de día se añade al final de la fase de inducción. Los sitios se clasifican por un técnico supervisor de irritación cutánea 24 horas después de la retirada, los martes y jueves, de los parches por los sujetos, y 48 horas después de la retirada, el sábado, de los parches, a menos que el

5 programa de aplicación de parches se altere como se ha descrito previamente.
Los sitios se clasifican de acuerdo con el siguiente sistema de puntuación:

Escala de puntuación dérmica

- 10 0 Ninguna reacción visible en la piel
+ Eritema apenas perceptible
1+ Eritema leve
2+ Eritema bien definido
3+ Eritema y edema graves
15 4+ Eritema y edema con vesiculación

Si se produce una reacción "2+" o mayor, el material de ensayo se aplica a un sitio intacto adyacente. Si se produce una reacción "2+" o mayor en el sitio nuevo, el sujeto no se aplica de nuevo el parche durante la fase de inducción, aunque supone un desafío en el día apropiado del estudio. A discreción del director del estudio, los sitios de parche con puntuaciones menores a "2+" pueden haber cambiado.

20 Después de un periodo aproximado de 2 semanas de descanso, los parches de estimulación se aplican a los sitios de ensayo no tratados previamente en la espalda. Tras haber transcurrido 24 horas, los parches se retiran por un técnico CRL, y los sitios de ensayo se evalúan para las reacciones cutáneas. Los sitios de ensayo se evalúan nuevamente a las 48 y 72 horas. Los sujetos que exhiben reacciones durante la fase de estimulación pueden haber sido citados para una lectura de 96 horas.

En base a la población del ensayo de 214 sujetos y en las condiciones de este estudio, el material de ensayo en crema para el contorno de ojos no demostró un potencial para provocar irritación cutánea o sensibilización.

30 **EJEMPLO 10**

Una serie de estudios se llevan a cabo para determinar la irritación cutánea y el potencial de sensibilización de un material de ensayo en forma de crema de día y crema para el contorno de ojos con las formulaciones desveladas previamente con un componente de factor de protección solar (FPS) adicional añadido a las formulaciones. Un FPS se define como la relación de la cantidad de energía requerida para producir un eritema mínimo sobre la piel protegida con respecto a la cantidad de energía necesaria para producir un eritema mínimo sobre la piel no tratada, calculado de la siguiente forma:

$$\text{FPS} = \frac{\text{DME en piel protegida J/m}^2}{\text{sitio de control sin proteger J/m}^2}$$

I. Se lleva a cabo un estudio para evaluar la eficacia de un producto de protector solar en combinación con una crema de día como se ha formulado previamente mediante la determinación del factor de protección solar (FPS), utilizando el método de ensayo de factor de protección solar (FPS) internacional (mayo de 2006) en condiciones estáticas. Una formulación de protector solar convencional se ensaya simultáneamente con el material de ensayo. El patrón es el patrón de FPS con padimato O/oxibenzona (COLIPA P2) (16,63 ± 3,43). La ubicación de la aplicación del material de ensayo/control es la espalda, y es aleatoria, de modo tal, que el área de la espalda que recibe el tratamiento con un material de ensayo individual no es la misma para todos los sujetos. Un total de 10 sujetos de sexo masculino y femenino, con edades comprendidas entre 25 a 57 años y, en general con buena salud, se seleccionan para el estudio. No se describen acontecimientos adversos durante el curso del estudio.

II. Se lleva a cabo un estudio para evaluar la eficacia de un producto de protector solar con un FPS 30 en combinación con una crema de día como se ha formulado previamente mediante la determinación de un factor de protección (FPA) contra la radiación ultravioleta A (UVA) en condiciones estáticas de acuerdo con el patrón de medición de la Asociación de la Industria Cosmética Japonesa (AICJ) para la protección contra los rayos UVA (01/01196). Un total de 10 sujetos adultos participaron en el estudio. Un simulador solar con múltiples puertos de arco de xenón (150w, Modelo 15S, Solar Light Company, Filadelfia, PA) que tiene un espectro de emisión continuo de luz ultravioleta en la región UVA y UVB (290-400 nm), se utiliza como fuente de irradiación de luz ultravioleta y se filtra para proporcionar un espectro similar solar básico. Se emplean los siguientes filtros para asegurar las salidas espectrales adecuadas: Schott WG33513 mm y UG1111 mm. La salida de la lámpara se mide inmediatamente antes del inicio de los ensayos de cada sujeto con un medidor de intensidad UV (Modelo PMA2100, Solar Light Company, Filadelfia, PA). Las distribuciones espectrales de la salida óptica de los simuladores solares se validan anualmente. El oscurecimiento pigmentario es una reacción marrón-gris a marrón negro observada en la piel humana después de la exposición a rayos UVA debido a una reacción de fotooxidación en la que se oxida un precursor incoloro de la

melanina para convertirse en melanina pigmentada. Un oscurecimiento pigmentario persistente mínimo (OPPM) se define como la dosis de irradiación de luz UVA necesaria para inducir una respuesta tal en la piel no tratada. Antes de la fase de ensayo, el OPPM de cada sujeto se determina por una secuencia geométrica progresiva de exposiciones a luz UV. El aumento de la dosis de radiación UVA es de 1,25. Dos a cuatro horas después de la irradiación, los sitios se evalúan para el oscurecimiento pigmentario de acuerdo con el siguiente sistema de puntuación:

0 Negativo, sin reacción visible

+ Oscurecimiento pigmentario (mínimo) apenas perceptible

1+ Oscurecimiento pigmentario (moderado) con bordes perceptibles inequívocos

2 + Oscurecimiento pigmentario pronunciado o bien definido

Los sitios de ensayo que miden 5 x 10 cm se exponen con un rotulador quirúrgico en la espalda del sujeto entre las escápulas y la línea de cintura, lateral a la línea media. Estas áreas se designan para el material de ensayo o patrón de protector solar. Un sitio adyacente se designa para una determinación simultánea de OPPM en la piel sin tratar. Después de la aplicación del producto, cada área de ensayo se subdivide en sitios de aproximadamente 1 cm² que se utilizan para exposición en serie definida a la luz UVA. Una porción de 0,1 ml de material de ensayo o patrón se aplica al sitio de ensayo apropiado y se extiende uniformemente en el sitio utilizando un dedal (equivalente a 2 µl/cm²). La irradiación de los sitios comenzó entre 15 minutos y 30 minutos después de la aplicación. Los tiempos de exposición se seleccionan para cada sitio tratado basado en el OPPM determinado previamente de la piel sin protección y el FPA previsto del material de ensayo o patrón. Todos los sitios de ensayo se evalúan dos a cuatro horas después de la exposición para determinar la respuesta de oscurecimiento pigmentario persistente mínimo. Un factor de protección de UVA (FPA) se define como la relación de la cantidad de tiempo requerido para producir un OPPM en la piel protegida con respecto a la cantidad de tiempo necesario para producir un OPPM en la piel sin tratar, calculado de la siguiente forma:

$$\text{FPA} = \frac{\text{OPPM en piel protegida}}{\text{sitio de control sin proteger}} \text{ OPPM}$$

El error estándar debe encontrarse dentro del 10 % de los valores medidos.

El número entero del valor medio de FPA de los sitios irradiados tratados determina el grado de protección de los rayos UVA. Para todos los valores FPA equivalentes a 2 o superiores, se aplica la siguiente clasificación para determinar el grado de protección:

Valor FPA	PA (Grado de protección de rayos UVA)
2 o más, pero menos de 4	4 PA+
4 o más, pero menos de 8	8 PA++
8 o más	PA+++

El material de ensayo presentado en crema de día con FPS 30 exhibió un valor medio de protección de rayos UVA de FPA 6,5, en los 10 sujetos.

III. Se lleva a cabo un estudio para evaluar un material de ensayo de una crema de día como se ha formulado previamente que contiene activos de protector solar para la protección de amplio espectro mediante la determinación de su longitud de onda crítica de conformidad con la AMA (Registro Federal/vol. 76, n.º 117/viernes, 17 de junio de 2011/Reglas y Reglamentos).

La absorbancia de un protector solar se integra (suma) a partir de 290 nm a través de las longitudes de onda UV hasta que la suma alcance el 90 % de la absorbancia total del protector solar en la región ultravioleta (290-400 nm). La longitud de onda en la que la absorbancia sumada alcanza el 90 % de la absorbancia total se define como la "longitud de onda crítica", y se considera que es una medida de la amplitud de la protección del protector solar. Un protector solar que tiene una parte significativa de su absorbancia en UVA puede clasificarse como "amplio espectro", cuando la longitud de onda crítica sea mayor a 370 nm.

Para cada longitud de onda en el espectro UV completo (290 a 400 nanómetros) se determina la transmitancia espectral. Los valores de transmitancia se miden en intervalos de 1 nanómetro.

La longitud de onda crítica del material de ensayo en crema de día con FPS es de 371,00 nm, que cumple con los criterios de longitud de onda crítica de un mínimo de 370 nm requerido para el etiquetado de "amplio espectro".

Se lleva a cabo un estudio de ensayo similar para evaluar un material de ensayo en crema de día como se ha formulado previamente que contiene activos de protector solar para la protección de amplio espectro mediante la determinación de su factor de protección UVA (UVA-FP) *in vitro*, su relación FPS/UVA-FP, y la longitud de onda crítica de la crema de día cumple con las directrices COLIPA, 2011.

REIVINDICACIONES

1. Un cosmético que comprende:

- 5 un aislado proteico de desove de peces que comprende una zonasa, una leucolectina o una combinación de las mismas, que se obtiene de huevos de peces en eclosión, en el que el aislado comprende una proteína activa que constituye de 1×10^{-8} a 1×10^{-5} porcentaje en peso total del cosmético; y
- 10 un extracto de producto natural extraído de una fuente seleccionada del grupo que consiste en algas rojas, algas verdes, algas marrones, cianobacterias con crecimiento en forma de césped y plantas o un componente de las mismas; en el que el extracto constituye de 0,01 a 10 porcentaje en peso total del cosmético y comprende esteroles y ácidos grasos insaturados.
- 15 2. El cosmético de la reivindicación 1, en el que dicho extracto de producto natural es un extracto de algas rojas, verdes o marrones o un extracto de hojas, tallos, brotes, raíces, frutos de plantas o una combinación de los mismos.
3. El cosmético de la reivindicación 2, en el que dicho extracto de producto natural es un extracto de algas rojas, verdes o marrones.
- 20 4. El cosmético de la reivindicación 3, en el que dicho extracto de producto natural es un extracto de algas marrones.
5. El cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho cosmético es una emulsión y comprende un emulsionante.
- 25 6. El cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho cosmético comprende manteca de karité.
7. El cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho cosmético comprende un glicol.
- 30 8. El cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha proteína activa es zonasa.
9. El cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho aislado proteico de desove de peces comprende leucolectina activa.
- 35 10. El cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichos huevos de pez son huevos de salmón.
11. El cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho cosmético comprende un biocida.
12. El cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho cosmético comprende un glucósido de ácido ascórbico.
- 40 13. El cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho cosmético está sustancialmente exento de silicona, vaselina, parabeno sintético, y aceite mineral.
- 45 14. Un proceso de mejora del aspecto de la piel que comprende aplicar a la piel el cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 al menos tres veces a la semana.
15. Un kit que comprende un cosmético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en un envase de uso múltiple no estéril junto con instrucciones para la aplicación del mismo a la piel a fin de favorecer el rejuvenecimiento de la piel.