

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 785**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 36/02 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2010 PCT/US2010/056520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO2011060252**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2010 E 10830782 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2499234**

54 Título: **Fracciones bioactivas de organismos fotosintéticos inducidos por estrés y procedimientos para su fabricación y uso**

30 Prioridad:

11.11.2009 US 260095 P

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

24.04.2017

73 Titular/es:

**ISP INVESTMENTS LLC (100.0%)
1011 Centre Road, Suite 315
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

**KOGANOV, MICHAEL;
DUEVA-KOGANOV, OLGA;
RECHT, PAUL y
DUEV, ARTYOM**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 609 785 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

Fracciones bioactivas de organismos fotosintéticos inducidos por estrés y procedimientos para su fabricación y uso

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica las ventajas de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos con n.º de Serie 61/260.095, presentada el 11 de noviembre de 2009, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a fracciones bioactivas aisladas de organismos fotosintéticos acuáticos inducidos por estrés, procedimientos para aislar las fracciones bioactivas, procedimientos para usar las fracciones bioactivas, y composiciones y formulaciones que contienen las fracciones bioactivas.

Antecedentes de la invención

15 Los factores de estrés ambiental son factores limitantes principales del desarrollo, crecimiento y productividad de las plantas. Existen dos tipos generales de factores de estrés que pueden producir respuestas de las plantas: (1) abióticos, que surgen de excesos o deficiencias en el entorno, y (2) bióticos, que están impuestos por otros organismos.

20 Las respuestas de las plantas a factores de estrés desencadenan modulación del metabolismo celular, alteración de la expresión genética, cambios en la tasa de crecimiento, rendimiento de fitomasa, y capacidades reproductoras. Las siguientes condiciones, entre otras, causan el estrés de la planta: exceso de agua e inundación, sequía, temperaturas altas o bajas, salinidad del suelo alta o baja, minerales inadecuados en el suelo, demasiada luz o muy poca luz, exposición a concentraciones elevadas de ozono y subexposición o sobreexposición a la luz UV.

La resistencia o la sensibilidad de los organismos fotosintéticos al estrés depende de la especie, genotipo, y edad de desarrollo. Hay tres mecanismos principales de resistencia al estrés: (1) mecanismos de evitación que previenen la exposición al estrés; (2) mecanismos de tolerancia que permiten que la planta soporte el estrés; y (3) aclimatación, es decir, la alteración de la fisiología de la planta como respuesta al estrés.

25 La respuesta al estrés se inicia cuando las plantas reconocen el estrés a nivel celular y a continuación el reconocimiento del estrés activa las rutas de transducción de señales que transmiten información dentro de la célula individual y en toda la planta. Los reguladores del estrés de la planta incluyen respuesta, pero no se limitan a, ácidos abscísico y jasmónico, factores de ajuste osmótico, osmotina, factores de estabilización de proteínas, proteínas de choque térmico, ARNm específicos, iones Ca^{2+} y metabolitos secundarios relacionados con las defensas.

30 La impresionante capacidad de las plantas para mantener niveles elevados de múltiples factores de estrés indica que el mecanismo de defensa es muy complejo por naturaleza e implica a múltiples mecanismos de adaptación celular y numerosas rutas metabólicas. Aunque este sistema de defensa completo y potente no se entiende todavía por completo, la utilización de sus componentes y sus interacciones puede ser muy beneficiosa.

35 La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2009/0031446 desvela polipéptidos y procedimientos de uso en plantas relacionados con el estrés: una planta transgénica transformada con un ácido nucleico codificante de SLSRP, en el que la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta da como resultado un aumento del crecimiento en condiciones de agua limitada y/o un aumento de la tolerancia a un estrés ambiental en comparación con una variedad de tipo silvestre de la planta.

40 Se demostró que la síntesis de la rutina, un flavonoide antioxidante en plantas de trigo sarraceno, se ve afectada por diferentes niveles de radiación UV-B: el contenido de rutina es menor en las plantas que crecen con un nivel de luz UV-B que corresponde a un agotamiento del ozono de un 17 %. Las dosis de radiación UV-B aplicadas ejercen un estado de estrés, en el que los límites de tolerancia se superan y la capacidad de adaptación está sobrecargada, dando como resultado posiblemente a una alteración en la síntesis de la rutina. Las mediciones sugieren que los niveles ambientales de radiación UV-B estimulan la acumulación de rutina en la planta de trigo sarraceno en comparación con el nivel de UV-B reducido. El efecto es más evidente en las hojas que en las flores. El aumento de la radiación UV-B obstruye la acumulación de rutina (Samo Kreft y col., Journal of Experimental Botany, Vol. 53, N.º 375, pp. 1801-1804, agosto de 2002).

50 La amplia diversidad fisicoquímica de los complejos y compuestos inducidos por estrés y la ausencia de "marcadores" específicos universales sugieren que la captura de todos los complejos y compuestos biológicamente activos inducidos por estrés en un solo extracto no es posible.

Por lo tanto, existe una necesidad de procedimientos y sistemas para generar y aislar fracciones bioactivas inducidas por estrés en plantas fotosintéticas. La presente invención se refiere a la superación de estas y otras deficiencias en la técnica.

Sumario de la invención

La presente invención por lo general se dirige a fracciones biológicamente activas obtenidas a partir de organismos fotosintéticos acuáticos inducidos por estrés definidos (denominando "BAFSI" a las fracciones biológicamente activas en el presente documento). Las BAFSI de la presente invención tienen complejos y compuestos con actividades objeto que se generan mediante mecanismos de defensa naturales. Las BAFSI se pueden capturar y aislar a través de tecnologías de fraccionamiento de plantas recién obtenidas y son muy adecuadas para su uso en formulaciones para el cuidado de la piel, cuidado solar, cuidado del cabello y cuidado personal y aplicaciones que comprenden al menos una BAFSI y otros ingredientes y agentes activos cosméticamente aceptables.

La materia objeto de la invención se establece en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a un procedimiento para aislar una fracción bioactiva alterada a partir de un organismo fotosintético acuático después de inducción por estrés, comprendiendo dicho procedimiento:

proporcionar un organismo fotosintético acuático;

cultivar el organismo fotosintético acuático en condiciones de cultivo inducido por estrés que comprende someter al organismo fotosintético a un factor de estrés o a una pluralidad de factores de estrés para producir un organismo fotosintético inducido por estrés que tenga una fracción bioactiva alterada y adecuado para su uso en el aislamiento de la fracción bioactiva alterada a partir del mismo;

en el que el factor de estrés o pluralidad de factores de estrés se selecciona entre el grupo que consiste en: estrés por luz ultravioleta mediante aplicación de radiación UVB de 1 o 2 mW/cm² de 3 a 12 horas al día; estrés por ozono mediante inyección de ozono para obtener un potencial redox de 200 a 400 y una concentración de O₂ disuelto de 7,0 a 9,0 mg/l; estrés osmótico mediante aplicación de una osmolalidad de medio de cultivo de 600 a 1200 mOs/kg; reducir la presión hidrostática en comparación con la de las condiciones originales; y una combinación de los mismos, y

en el que el factor de estrés o pluralidad de factores de estrés alteran al menos una característica de al menos una fracción bioactiva aislada del organismo fotosintético inducido por estrés en comparación con una fracción bioactiva correspondiente aislada de un organismo fotosintético no inducido por estrés;

separar el organismo fotosintético inducido por estrés en jugo celular y un componente de las paredes celulares; tratar el jugo celular en condiciones eficaces para producir una fracción bioactiva, en el que dicha fracción bioactiva se selecciona entre el grupo que consiste en una fracción de suero celular, una fracción de membrana, una fracción de sobrenadante de jugo celular, y una fracción de filtrado de suero celular; y

aislar dicha fracción bioactiva del jugo celular tratado, en el que la fracción bioactiva aislada tiene al menos una característica alterada en comparación con una fracción bioactiva correspondiente aislada de un organismo fotosintético no inducido por estrés, en el que dicho organismo fotosintético acuático es un organismo fotosintético acuático de una clase seleccionada entre el grupo que consiste en Phaeophyceae y Chlorophyceae, o una *Macrocystis* spp., seleccionada entre el grupo que consiste en *Macrocystis angustifolia*, *Macrocystis integrifolia*, *Macrocystis laevis*, y *Macrocystis pirifera*, o una *Chaetomorpha* spp. seleccionada entre el grupo que consiste en *Chaetomorpha area*, *Chaetomorpha antennina*, *Chaetomorpha basiretorsa*, *Chaetomorpha brachygona*, *Chaetomorpha californica*, *Chaetomorpha cannabina*, *Chaetomorpha crassa*, *Chaetomorpha gracilis*, *Chaetomorpha linum*, *Chaetomorpha melagonium*, *Chaetomorpha natalensis*, y *Chaetomorpha spiralis*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una formulación bioactiva tópica adecuada para aplicación tópica a un mamífero, en la que la formulación tópica bioactiva incluye (i) una cantidad tópicamente eficaz de la composición bioactiva de la presente invención y (ii) un vehículo tópicamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un sistema para cultivar los organismos fotosintéticos acuáticos inducidos por estrés definidos. Este sistema incluye (i) un biorreactor para cultivar un organismo fotosintético; y (ii) un sistema de control de cultivo para controlar las condiciones de cultivo en el biorreactor. El sistema de control de cultivo está configurado para introducir una combinación de dos o más factores de estrés en el biorreactor, y está configurado para modular la intensidad, duración, y/o concentración de la combinación de dos o más factores de estrés en el biorreactor. La combinación de dos o más factores de estrés se selecciona entre el grupo que consiste en luz ultravioleta, ozono, presión osmótica, presión hidrostática, y una combinación de los mismos.

Los complejos y compuestos biológicamente activos inducidos por estrés ("SIBAC") aislados a través de tecnologías de fraccionamiento de plantas recién obtenidas también se pueden describir de forma precisa como fracciones biológicamente activas de organismos fotosintéticos inducidos por estrés (en el presente documento abreviado como "BAFSI"). Como se usa en el presente documento, las expresiones "biológicamente activo" y "bioactivo" se usan indistintamente.

Las BAFSI contienen complejos y compuestos que son generados por mecanismos de defensa naturales, que protegen a los organismos fotosintéticos (plantas, organismos marinos) frente a diversos factores de estrés y proporcionan un acceso posterior a todos estos complejos y compuestos y una base para su evaluación.

De forma sorprendente e inesperada se encontró que diversos factores de estrés, su intensidad y su duración generan efectos moduladores (aumento, disminución o alteración) en las diversas características de las BAFSI, que

incluyen, pero no se limitan a: propiedades fisicoquímicas (contenido de materia seca; osmolalidad, tensión superficial, capacidades de modificación de superficie) y actividades biológicas que incluyen, pero no se limitan a: inhibición enzimática; actividad antioxidante y neutralización de radicales libres.

5 De forma inesperadamente también se encontró que los factores de estrés similares aplicados a diferentes organismos fotosintéticos pueden producir diferentes efectos en las características de BAFSI obtenidos a partir de estas plantas.

10 Diversos factores de estrés aplicados a los organismos fotosintéticos cultivados inducen generación de BAFSI con actividades biológicas y propiedades fisicoquímicas deseables, que también puede ser útiles en composiciones y aplicaciones para el cuidado de la piel, protección solar, cuidado del cabello y composiciones para el cuidado personal. Por ejemplo, las BAFSI de la presente invención se pueden usar como ingredientes que regulan la actividad de ciertas enzimas (tripsina, elastasa, etc.), que desempeñan papeles importantes en el metabolismo de la piel humana, así como ingredientes con actividades antioxidantes y de neutralización de radicales libres. El aislamiento y la identificación sistemática de las BAFSI potenciales con la combinación óptima de las propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas útiles que incluyen, pero no se limitan a, actividades de neutralización de antioxidantes y radicales libres; inhibición de enzimas asociadas con el envejecimiento de la piel y daño ambiental, protección de la piel y reparación de tejidos humanos, pueden crear una base para el desarrollo de nuevos ingredientes multifuncionales para su uso en los mercados de cuidado de la piel, protección solar, cuidado del cabello y el cuidado personal.

20 La presente invención también se refiere a un procedimiento que incluye: inducción de factores de estrés durante el cultivo de diversos organismos fotosintético su acuáticos; recogida de material de plantas recién obtenidas a partir de plantas sometidas a estrés; su fraccionamiento para aislar BAFSI de núcleo enriquecidas como complejos y compuestos biológicamente activos inducidos por estrés; identificación de BAFSI con actividades objetivo deseables; y su uso en formulaciones y aplicaciones para el cuidado de la piel, protección solar, cuidado del cabello y para cuidado personal.

25 En diversas realizaciones de la presente invención, la generación de BAFSI se inició mediante diferentes factores de estrés definidos que son luz ultravioleta (UV), ozono (O₃), presión osmótica y reducción de la presión hidrostática. Las señales de estrés básico de entrada incluyen, pero no se limitan a, función de impulso ($f(t) = \delta(t)$), función de etapa unitaria ($f(t) = u(t)$), y función rampa ($f(t) = t$).

Breve descripción de las figuras

30 Con el fin de ilustrar la invención, en las figuras se representan ciertas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones e instrumentalidades precisas de las realizaciones representadas en las figuras.

La **FIG. 1** es un esquema que muestra diversas funciones usadas para la aplicación de estrés (es decir, factores de estrés) de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención.

35 La **FIG. 2** es un gráfico que muestra las funciones que describen factores de estrés aplicados a organismos acuáticos de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención. En el caso de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*), existe un factor adicional de estrés hidrostático, ya que el cultivo en acuarios proporciona menos presión de agua de la habitual para condiciones de cultivo natural para la especie. El estrés hidrostático comienza cuando el alga marina se retira de su entorno normal y termina con el final del experimento. Se trata de un factor que se aplica a todas las algas marinas en el experimento del mismo modo y por lo tanto no se muestra.

La **FIG. 3** es un gráfico que muestra el contenido de materia seca (porcentaje de materia seca en peso) de diversas fracciones bioactivas de la presente invención aisladas de alga marina.

45 La **FIG. 4** es un gráfico que muestra los valores de osmolalidad de las diversas muestras de algas marinas de la presente invención como miliOsmoles por kilogramo (mOsm/kg).

La **FIG. 5** es un gráfico que muestra la osmolalidad (mOsm/kg) producida por porcentaje de contenido de peso seco de diversas muestras de algas marinas de la presente invención.

La **FIG. 6** es un gráfico que muestra los valores de tensión superficial de las diversas muestras de algas marinas de la presente invención, expresados como miliNewtons por metro (mN/m).

50 La **FIG. 7** es un gráfico que muestra el ángulo de contacto del agua desionizada en sustrato Vitro Skin modificado b por diversas muestras de algas marinas de la presente invención, expresado como grados.

La **FIG. 8** es un gráfico que muestra la eficacia de inactivación de radicales libres de diversas muestras de algas marinas de la presente invención, expresado como unidades de peso de la materia seca de la muestra necesarias para inactiva completamente 1 unidad de peso de DPPH. Los valores más bajos representan una eficacia más elevada en la inactivación de DPPH.

La **FIG. 9** es un gráfico que muestra los valores de Cl₅₀ de elastasa mostrados como miligramos de materia seca de diversas muestras de algas marinas de la presente invención por mililitro de volumen de reacción.

La **FIG. 10** es un gráfico que muestra los valores de Cl₅₀ de tripsina mostrados como miligramos de materia seca de diversas muestras de algas marinas de la presente invención por mililitro de volumen de reacción.

60 La **FIG. 11** es un gráfico que muestra los cambios en el contenido en contenido de materia seca de BAFSI de

Chaetomorpha con respecto al control. Los artículos de ensayo se muestran como porcentaje de la diferencia de la muestra de control tomada el mismo día.

La FIG. 12 es un gráfico que muestra los cambios de osmolalidad de BAFSI de *Chaetomorpha* con respecto al control. Los artículos de ensayo se muestran como porcentaje de la diferencia de la muestra de control tomada el mismo día.

La FIG. 13 es un gráfico que muestra los cambios en la osmolalidad por porcentaje de materia seca de BAFSI de *Chaetomorpha* con respecto al control. Los artículos de ensayo se muestran como porcentaje de la diferencia de la muestra de control tomada el mismo día.

La FIG. 14 es un gráfico que muestra los cambios en la inhibición de elastasa de BAFSI de *Chaetomorpha* con respecto al control, mostrados como porcentaje de la diferencia de la muestra de control tomada el mismo día. El protocolo proporciona resultados de Cl_{50} calculados a partir de la materia seca de los artículos de ensayo. En este gráfico, los valores de Cl_{50} más bajos representan una inhibición más elevada y los cambios negativos se muestran como más elevados.

La FIG. 15 es un gráfico que muestra los cambios en la tensión superficial de BAFSI de *Chaetomorpha* con respecto al control, expresados como porcentaje de la diferencia de la muestra de control tomada el mismo día.

La FIG. 16 es un gráfico que muestra los cambios en la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de BAFSI de *Chaetomorpha* con respecto al control, expresados como porcentaje de la muestra de control tomada el mismo día. El protocolo de ensayo usado proporciona resultados como equivalencia inversa en peso de (R)-Trolox metil éter (es decir, X unidades de peso seco del artículo de ensayo para conseguir el mismo efecto antioxidante que 1 unidad de peso de (R)-Trolox metil éter). Por lo tanto, en este gráfico los números más bajos representan una eficacia más elevada, y los cambios negativos se muestran como más elevados.

La FIG. 17 es una fotografía de una realización del sistema de la presente invención. Se muestra que el sistema es eficaz para cultivar organismos fotosintéticos acuáticos en condiciones controladas y para aplicar diversos factores de stress.

Descripción detallada de la invención

La presente invención por lo general se refiere a fracciones biológicamente activas de organismos fotosintéticos acuáticos inducidos por estrés definidos, haciendo referencia a las fracciones bioactivas de la presente invención en el presente documento con la abreviatura "BAFSI". Las BAFSI de la presente invención contienen complejos y compuestos con actividades biológicas objetivo, y se generan mediante mecanismos de defensa naturales de los organismos fotosintéticos que se capturan y aíslan a través de tecnologías de fraccionamiento de plantas recién obtenidas. Las BAFSI son muy adecuadas para su uso en formulaciones y aplicaciones para el cuidado de la piel, cuidado solar, cuidado del cabello, y cuidado personal.

La presente invención también se refiere a composiciones para el cuidado de la piel, cuidado solar, cuidado del cabello, y cuidado personal que comprenden (a) al menos una BAFSI y (b) otros ingredientes y agentes activos cosméticamente aceptables.

La presente invención también se refiere a composiciones cosméticas o dermatológicas que se pueden aplicar por vía tópica muy adecuadas para la fotoprotección de UV de la piel y/o cabello humanos que comprenden una cantidad fotoprotectora de UV eficaz de: (a) al menos un agente de pantalla de UV; (b) al menos una BAFSI; y (c) otros ingredientes y polímeros funcionales cosméticamente aceptables.

A continuación en el presente documento se proporcionan aspectos adicionales de la presente invención, incluyendo detalles adicionales que son adecuados para un alguien con una experiencia habitual en la materia para fabricar y usar estos aspectos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, una fracción bioactiva alterada de la presente invención se refiere a una fracción bioactiva aislada de un organismo fotosintético acuático inducido por estrés definido, en el que esa fracción bioactiva tiene al menos una característica alterada en comparación con una fracción bioactiva correspondiente aislada de un organismo fotosintético no inducido por estrés. Una característica alterada puede ser una propiedad fisicoquímica alterada, propiedad de modificación de superficie alterada, propiedad de hidratación alterada, actividad antiinflamatoria alterada, y/o actividad de antienviejimiento alterada. En una realización en particular, una característica alterada mejora una bioactividad o una propiedad de la fracción bioactiva de la presente invención en comparación con la bioactividad o propiedad de una fracción bioactiva correspondiente de un organismo fotosintético no inducido por estrés. En otra realización, la al menos una característica alterada se refiere a un cambio de una o más bioactividades o propiedades de la fracción bioactiva de la presente invención en comparación con las bioactividades o propiedades de una fracción bioactiva correspondiente de un organismo fotosintético no inducido por estrés.

Las condiciones de cultivo de inducción por estrés adecuadas son las que se describen en el presente documento. Como se establece en el presente documento, el factor de estrés o pluralidad de factores de estrés son luz ultravioleta, ozono, presión osmótica, presión hidrostática, y/o una combinación de los mismos. Como se establece en el presente documento, el factor de estrés o pluralidad de factores de estrés son eficaces para alterar al menos una característica de al menos una fracción bioactiva aislada del organismo fotosintético inducido por estrés en comparación con una fracción bioactiva correspondiente aislada de un organismo fotosintético no inducido por

estrés.

Como se usa en el presente documento, las propiedades fisicoquímicas incluyen, pero no se limitan a, propiedades tales como as tensión superficial, contenido de materia seca, y osmolalidad.

5 Como se usa en el presente documento, las actividades antiinflamatorias y/o antienvjecimiento incluyen, pero no se limitan a, actividades tales como inhibición de elastasa, inhibición de tripsina, actividad antioxidante, y actividad de neutralización de radicales libres.

Las fracciones bioactivas que se pueden aislar a partir de los organismos fotosintéticos acuáticos inducidos por estrés definidos son una fracción de suero celular, una fracción de membrana, una fracción de sobrenadante de jugo celular, y una fracción de filtrado de suero celular.

10 De acuerdo con la presente invención, un organismo fotosintético acuático se selecciona entre organismos fotosintéticos acuáticos de las clases Phaeophyceae y Chlorophyceae. En particular, el organismo fotosintético acuático puede incluir, pero no se limita a, especies de los géneros *Macrocystis* y *Chaetomorpha*. Las especies adecuadas del género *Macrocystis* pueden incluir, pero no se limitan a, *Macrocystis angustifolia*, *Macrocystis integrifolia*, *Macrocystis laevis*, y *Macrocystis pirifera*. Las especies adecuadas del género *Chaetomorpha* pueden
15 incluir, pero no se limitan a, *Chaetomorpha aerea*, *Chaetomorpha antennina*, *Chaetomorpha basiretorsa*, *Chaetomorpha brachygona*, *Chaetomorpha californica*, *Chaetomorpha cannabina*, *Chaetomorpha crassa*, *Chaetomorpha gracilis*, *Chaetomorpha linum*, *Chaetomorpha melagonium*, *Chaetomorpha natalensis*, y *Chaetomorpha spiralis*.

20 En una realización, las fracciones bioactivas y los complejos y compuestos inducidos por estrés en el organismo fotosintético inducido por estrés de la presente invención se pueden capturar y aislar a través de tecnologías de fraccionamiento de plantas recién obtenidas que se describen en los siguientes documentos de patente de Estados Unidos n.ºs y solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas n.ºs: documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 7.537.791, 7.442.391, y 7.473.435; y Publicaciones de Solicitudes de Patente de Estados Unidos n.ºs: US2007/0196523, US2009/0186109, US2009/0185990 y US2009/0017144.

25 En vista de las técnicas de aislamiento descritas en el presente documento y en vista de las tecnologías de fraccionamiento de plantas recién obtenidas en señaladas en las patentes y solicitudes de patente publicadas de Estados Unidos, alguien con experiencia habitual en la materia puede determinar fácilmente cómo producir las fracciones bioactivas aisladas de la presente invención. Para fines de referencia, a continuación se presenta una breve sinopsis de las enseñanzas de cada una de las patentes y solicitudes de patente publicadas de Estados
30 Unidos mencionadas anteriormente.

El documento patente de Estados Unidos n.º 7.537.791 desvela ingredientes bioactivos sin partenólidos de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y procedimientos para su producción.

El documento patente de Estados Unidos n.º 7.442.391 desvela composiciones cosméticas botánicas bioactivas y procedimientos para su producción.

35 El documento patente de Estados Unidos n.º 7.473.435 desvela composiciones bioactivas de plantas de *Theaceae* y procedimientos para su producción y uso.

La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2007/0196523 desvela ingredientes bioactivos sin partenólidos de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y procedimientos para su producción.

40 La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2009/0186109 desvela ingredientes bioactivos sin partenólidos de matricaria (*Tanacetum parthenium*) y procedimientos para su producción.

La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2009/0185990 desvela composición bioactivas de plantas de *Theaceae* y procedimientos para su producción y uso.

La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2009/0017144 desvela composiciones cosméticas botánicas bioactivas y procedimientos para su producción.

45 Como alguien con una experiencia habitual en la materia puede apreciar, estas tecnologías de fraccionamiento y aislamiento proporcionan medios para capturar completamente todo el material intracelular y distribución de todos sus componentes entre fracciones de núcleo, que se aíslan a partir de material vegetal recién obtenido sin ningún disolvente o agente químico externo y sin dañar la homeostasis de la presión osmótica intracelular. Como resultado, la integridad de todos los orgánulos y componentes del citoplasma de los organismos fotosintéticos sometidos a
50 diversos factores de estrés se puede conservar completamente y aislar en diversas fracciones.

Las fracciones bioactivas aisladas producidas con el procedimiento de aislamiento de la presente invención tienen al menos una característica alterada en comparación con una fracción bioactiva correspondiente aislada de un organismo fotosintético no inducido por estrés. Las características que se pueden alterar en las fracciones bioactivas aisladas son propiedades fisicoquímicas, propiedades de modificación de superficie, propiedades hidratantes,

actividad antiinflamatoria, y actividad de antienvjecimiento.

5 La presente invención también se refiere a una composición bioactiva que incluye una fracción bioactiva aislada obtenida a partir de un organismo fotosintético inducido por estrés, en la que la fracción bioactiva es una fracción de suero celular, una fracción de membrana, una fracción de sobrenadante de jugo celular, o una fracción de filtrado de suero celular.

10 La fracción bioactiva usada en la composición bioactiva se aísla a partir de un organismo fotosintético acuático inducido por estrés definido que se ha sometido a un factor de estrés definido o a una pluralidad de factores de estrés en condiciones eficaces para alterar al menos una característica de la fracción bioactiva aislada en comparación con una fracción bioactiva correspondiente aislada de un organismo fotosintético no inducido por estrés. Las características alteradas y los diversos factores de estrés son como se proporcionan en el presente documento.

15 En una realización, la composición bioactiva también puede incluir un agente estabilizante. Los agentes estabilizantes adecuados para su uso en la composición bioactiva de la presente invención se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de agentes estabilizantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, emulgentes, conservantes, antioxidantes, matrices poliméricas, y mezclas de los mismos.

20 En una realización, la fracción bioactiva está sustancialmente libre de componentes no deseados que incluyen, pero no se limitan a, proteínas. La ausencia de proteínas es importante porque las proteínas residuales pueden provocar dermatitis por contacto (V. Janssens, y col., "Protein contact dermatitis: myth or reality?", British Journal of Dermatology 1995; 132: 1-6). Además, la presencia de proteínas puede crear cuestiones de estabilidad y compatibilidad con la formulación de productos acabados.

La presente invención también se refiere a una formulación bioactiva tópica adecuada para aplicación tópica a un mamífero, en la que la formulación tópica bioactiva incluye (i) una cantidad tópicamente eficaz de la composición bioactiva de la presente invención y (ii) un vehículo tópicamente aceptable.

25 Los vehículos tópicamente aceptables adecuados para su uso en la composición bioactiva de la presente invención se conocen bien en la técnica. Un vehículo tópicamente aceptable adecuado puede incluir, pero no se limita a, una base de crema hidrófila, una base de loción hidrófila, una base de tensioactivo hidrófila, una base de gel hidrófila, una base de solución hidrófila, una base de crema hidrófoba, una base de loción hidrófoba, una base de tensioactivo hidrófoba, una base de gel hidrófoba, and una base de solución hidrófoba.

30 En diversas realizaciones, las fracciones, composiciones y formulaciones bioactivas de la presente invención son "cosméticamente aceptables". Como se usa en el presente documento, la expresión "cosméticamente aceptable" se refiere a fracciones, composiciones, ingredientes, formulaciones, agentes cosméticamente activos, o ingredientes inertes bioactivos que son adecuados para su uso en contacto con tejidos de mamíferos (por ejemplo, la piel de seres humanos) sin excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, proporcionar con una proporción razonable de beneficio/riesgo.

35 En diversas realizaciones, las fracciones, composiciones y formulaciones bioactivas de la presente invención son útiles para aplicación tópica a seres humanos, y se pueden aplicar en una "cantidad segura y eficaz". Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad segura y eficaz" se refiere a una cantidad de fracción, composición, ingrediente, o formulación bioactivos suficiente para inducir de forma significativa una modificación positiva en la afección a regular o tratar, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves. La cantidad segura y eficaz de la composición, ingrediente o formulación bioactivos que contiene la fracción bioactiva variará con la afección en particular que se está tratando, la edad y condición física del usuario final, la gravedad de la afección que se está tratando/previniendo, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea, el ingrediente o formulación bioactivos específicos usados, el vehículo tópico cosméticamente aceptable usado en particular, y factores similares.

45 Las formulaciones que contienen las fracciones o composiciones bioactivas de la presente invención se pueden preparar usando metodología que es bien conocida por un experto con una experiencia habitual.

50 La formulación tópica bioactiva se puede formular de modo que la composición bioactiva esté presente en una cantidad que varía entre aproximadamente un 0,01 por ciento y aproximadamente un 98,0 por ciento del peso total de la formulación tópica bioactiva. La presente invención contempla formulaciones tópicas bioactivas que tienen concentraciones de la composición bioactiva que entran dentro del intervalo indicado de un 0,01 a un 98,0 por ciento, incluyendo los puntos terminales (es decir, un 0,01 y un 98,0 por ciento). Alguien con una experiencia habitual en la materia puede determinar fácilmente la concentración de la e composición bioactiva adecuada para su uso en una formulación tópica en particular.

55 La formulación tópica bioactiva de la presente invención es adecuada para su uso en diversas aplicaciones, que incluyen, por ejemplo, aplicaciones para el cuidado de la piel, aplicaciones para cuidado de la piel, aplicaciones para cuidado del cabello, y aplicaciones para cuidado personal. Alguien con una experiencia habitual en la materia puede determinar fácilmente otros usos de la formulación tópica bioactiva en otras aplicaciones.

La formulación tópica bioactiva de la presente invención es adecuada para su uso como una loción, que incluye, pero no se limita a, una loción cutánea, un gel protector solar, una loción hidratante, una loción de protección solar, una loción de gel facial, una loción de tonificación facial, y una loción antienvjecimiento. Alguien con una experiencia habitual en la materia puede determinar fácilmente otras lociones que pueden incorporar la formulación tópica bioactiva de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "mamífero" incluye, pero no se limita a, seres humanos.

El sistema de la presente invención se usa para cultivar un organismo fotosintético acuático, en el que el biorreactor está configurado para cultivar el organismo fotosintético acuático en un medio líquido. Un ejemplo de una configuración adecuada del sistema para su uso con organismos fotosintéticos acuáticos se ilustra en la FIG. 17. En una realización particular, el biorreactor puede ser, pero no se limita, un acuario. En la Tabla 1 (véase a continuación en el presente documento) se exponen diversos componentes de una realización del sistema de la presente invención. En vista de las enseñanzas en el presente documento, alguien con una experiencia habitual en la materia puede determinar fácilmente otros componentes generales o específicos adecuados para su uso en el sistema de la presente invención, y por lo tanto esos otros componentes generales o específicos se contemplan en la presente invención.

En el presente documento se establecen a continuación detalles adicionales con respecto a los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención.

En una realización, el alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) se seleccionó debido a su tasa de crecimiento rápida y capacidad para sobrevivir en condiciones extremas, en particular a presión elevada y temperatura relativamente baja. Se encuentra frente a las costas de varios continentes alrededor del mundo, por ejemplo, frente a la costa oeste de América del Norte, desde el sur de Alaska a la Baja California; frente a la costa de Sudamérica, el sur de África, y el sur de Australia. Para que el alga marina marrón gigante prospere en un entorno en particular, debe tener una superficie dura para su unión, concentración de nutrientes elevada, movimiento moderado de agua, y agua oceánica transparente y limpia. *Macrocystis* prefiere el agua salada, bien mezclada, salada en las aguas costeras exteriores (Connor J, Baxter C, Kelp Forest. Monterey Bay Aquarium Foundation, Monterey: 1989). El alga marina marrón gigante es una fuente rica en yodo, calcio, y azufre, y una buena fuente de hierro, fósforo, sodio, potasio, magnesio, y las vitaminas A, D, E, K, y el complejo B. Los componentes principales de alga marina son: mucopolisacáridos, alginatos, compuestos fenólicos, lípidos polares, y diglicéridos de éster de glicosilo, así como proteína, carbohidratos, ácidos grasos esenciales, aminoácidos, y aproximadamente treinta minerales, clorofila a y c, así como carotenos y xantófilas (Wurges, J., y R. J. Frey. 2005. En J. L. Longe, The Gale Encyclopedia of Alternative Medicine, Farmington Hills, Mich: Thomson/Gale. ISBN 0787693960). Las paredes celulares están formadas por celulosa en capas con polisacáridos (tales como el valioso ácido algínico).

Las estipes de las algas marinas gigantes son similares a los tallos de las plantas terrestres. Los azúcares esenciales producidos en la fotosíntesis se usan para alimentar sus propias necesidades metabólicas, así como su transporte a otras partes de las algas, incluyendo el disco adhesivo, hojas que producen esporas, y nuevos conjuntos de hojas.

Las hojas de alga marina marrón gigante son el sitio en el que se captura la mayor parte de la energía de la luz del sol y se convierte en azúcares por la fotosíntesis; a continuación, los azúcares producidos son usados por las algas para obtener energía. Los neumatocistos del alga marina marrón gigante son cámaras llenas de gas que actúan como boyas para elevar las hojas más cerca de la superficie en la que se puede producir la fotosíntesis (Bold HC, Wynne M J. Introduction to the Algae. Prentice Hall, Englewood Cliffs: 1978).

Un disco adhesivo de alga marina gigante tiene un aspecto similar al de las raíces. Sin embargo, estas raíces no absorben nutrientes ni agua tal como lo hacen las plantas terrestres. El disco adhesivo mantiene la posición del alga marina. El disco adhesivo del alga marina gigante es perenne, y tendrá una duración de uno a siete años (Connor J, Baxter C, Kelp Forest. Monterey Bay Aquarium Foundation, Monterey: 1989).

En otra realización, las algas verdes (*Chaetomorpha linum*) se seleccionaron debido a su rápida tasa de crecimiento, su capacidad para sobrevivir a temperatura relativamente elevada y su nivel elevado de actividad fotosintética con respecto a *Macrocystis pirifera*. *Chaetomorpha linum* se encuentra en arrecifes de subtropicales a tropicales del Océano Pacífico relativamente poco profundos. Se trata de algas que flotan libremente que crecen en racimos filamentosos sin unión a ningún sustrato. *Chaetomorpha linum* se cultiva frecuentemente en agua para su uso como un filtro natural impurezas, especialmente nitratos.

En otra realización, la generación de BAFSI comenzó mediante diferentes factores de estrés que incluyen, pero no se limitan a, luz ultravioleta (UV), ozono (O₃), presión osmótica (Biological Control Systems Analysis. John H. Milsum - McGraw-Hill Book Company NY, 1966), y el cambio significativo en condiciones de cultivo originales, por ejemplo, en presión hidrostática.

En una realización, las señales básicas de estrés de entrada que se presentan en la FIG. 1 incluyen, pero no se limitan a, función de impulso ($f(t) = \delta(t)$), función de etapa unitaria ($f(t) = u(t)$), y función rampa ($f(t) = t$). Las funciones que describen los factores de estrés aplicados a las algas se muestran en la FIG. 2.

En otra realización, en el caso del alga marina gigante, existe un factor adicional de estrés hidrostático, ya que el cultivo en acuarios proporciona menos presión de agua que la habitual para las condiciones de crecimiento natural para la especie. El estrés hidrostático comienza cuando el alga marina se retira de su entorno normal y termina con el final del experimento. Se trata de un factor que se aplica a todas las algas marinas en el experimento del mismo modo y por lo tanto no se muestra.

5

Condiciones y Parámetros de Cultivo

En una realización de la presente invención, se permitió el ciclo de cuatro acuarios idénticos de 150 litros durante 14 días con 35 g/l de agua marina artificial. A continuación, el alimento para algas Proline F/2 se añadió a cada acuario y se mantuvo controlando el nivel de nitrato durante el transcurso del cultivo. La información detallada con respecto a los componentes del equipo de la presente realización se presenta en la **Tabla 1**.

10

Tabla 1

Descripción del Equipo de Cultivo y Componentes del Sistema de Control	
Componentes	Descripción y Fabricante
Diseño del Acuario	West Coast Aquatics Mini Ocean 18" x 48" x 18" con filtración y cámara de acondicionamiento que incluye un enfriador 1/4 hp de W. C. Aquatics, bomba de acuario sumergida Penguin 1140, bomba de aire Krypton 700, y calentador de la Serie Silver de 300 W de W.C. Aquatics (West Coast Aquatics, CA)
Sistema de Iluminación	Elementos fijos fluorescentes compactos Current 30" Dual Satellite con bombilla de 6.700/10.000 K de Luz de Día Dual de 65 W y bombilla de 420/460 nm Actínica Dual de 65 W (Current-USA, CA)
Fabricador de Olas	2 - Bombas de acuario sumergidas Penguin 1140 (Marineland, CA)
Sistema de Control del Acuario	Sistema de Adquisición de Datos de 22 Bits y 20 Canales OMB-DAQ-56 2 con el Módulo de Expansión de 20 Canales OMB-PDQ1 20 y los Módulos I/O Digitales 12 ACO5-C a la salida de AC de 3A, con el Software DASYLAB de desarrollo informático unido (Omega Engineering, Inc., CT)
Sonda de Conductividad	CDE-300 (Omega Engineering, Inc., CT)
Sonda de pH	Omega PHE-7351-15 (Omega Engineering, Inc., CT)
Sonda Redox	Omega ORE-1311 (Omega Engineering, Inc., CT)
Sonda de Temperatura	Omega KTXL-14U-12 T/C (Omega Engineering, Inc., CT)
Medidor de Oxígeno Disuelto	Hanna HI 9143 (Hanna Instruments, RI)
Generador de O ₃	Salida ajustable de 0 a 200 mg/h. Aquazone Plus 200 (Red Sea, TX)
Bomba de Aire para el Sistema de O ₃	Whisper AP 150 - 150 lph (Tetra US, VA)
Inyector y Mezcladora de O ₃	Mezcladora Estática de Ozono MX-500P e Inyector Kynar MK-584 (Ozone Solutions, Inc., IA)
Bomba de Agua para el Sistema de O ₃	Eheim 1250 - 720 lph (Eheim GmbH, Alemania)
Sensor / Analizador de O ₃	Sensor de Ozono Analog Plus con Analizador de Ozono Disuelto AV88 (Aquasensors, WI)
Fuente de UV	Lámparas de mesa XX-15MR, MR 302 nm, 15 W (UVP LLC, CA); 2 elementos fijos, cada uno con dos lámparas de mesa
Medidor de UV	Modelo UVX de Radiómetro Digital (Parte n.º 97-0015-02) con el Modelo UVX-31 de sensor de gama media (UVP LLC, CA) (Parte n.º 97-0016-04)
Kits de Ensayo	API Para NH ₃ /NH ₄ , NO ₂ , NO ₃ , PO ₄ , Ca ²⁺ , KH (Mars Fishcare, Inc., PA)

El sistema de iluminación con fluorescente compacto usado modeló las propiedades de la luz solar natural en condiciones superficiales y subsuperficiales. La fuente de UV modeló la radiación en la región UVB. Los productores de olas proporcionaron flujo de agua y turbulencia para simular las condiciones ambientales naturales. Un sistema de control controlaba el pH, potencial redox, conductividad, concentración de ozono y temperatura. Además, programadores controlaban los sistemas de iluminación, UV y ozono. También se controlaron osmolalidad, índice de refracción, y gravedad específica junto con niveles de amoníaco, nitrito, nitrato, fosfato, calcio y dureza de carbonato (KH). Como control siempre se usaba un acuario y otros tres se usaron para introducir (a) tres diferentes niveles de factor de estrés seleccionado o (b) tres tipos diferentes de factores de estrés.

En la **FIG. 17** se presenta una fotografía de estos acuarios con alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) cultivada.

En una realización, el estrés UVB en los acuarios se aplicó con luces UVB externas. Dos elementos fijos de luz UVB de 30 Vatios se instalaron en los acuarios y la intensidad de los rayos UVB se midió con un radiómetro de UVX. El estrés de ozono en los acuarios se introdujo por inyección de ozono en los acuarios con el sistema y se describe en la **Tabla 1**. Los acuarios sin generación de ozono también tenían el mismo sistema de inyección de ozono instalado para eliminar las diferencias en el flujo de aire y agua. La concentración de ozono disuelto se midió con Sensor y Analizador de Ozono Aquasensors. El estrés osmótico en los acuarios se introdujo a través de regulación de la concentración de agua salada. La osmolalidad se midió con el Modelo 3250 de Osmómetro de depresión del punto de congelación (Advanced Instruments, Inc., MA). El estrés hidrostático (reducción de las condiciones de presión hidrostática) en los acuarios era en efecto para el alga marina gigante marrón, que por lo general crece en aguas más profundas (3 m o más profundas). Los intervalos de los parámetros de cultivo usados para factores de estrés de sistemas de control y de estrés y sus parámetros se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2

Rangos de Parámetros de Cultivo Usados para Acuarios de Control y Estresados					
Parámetro de Cultivo	Control	Estrés por Ozono	Estrés Osmótico	Estrés por UV	Estrés Hidrostático***
pH	8,0-8,3	8,0 - 8,3	8,0-8,3	8,0-8,3	8,0-8,3
Conductividad (S/m)	4,6-5,1	4,6-5,1	3,5 - 6,0	4,6-5,1	4,6-5,1
Temperaturas (C)	*	*	*	*	*
Potencial redox	150 - 250	200 - 400	150 - 250	150 - 250	150 - 250
O ₂ disuelto (mg/l)	7,0 - 8,0	7,0 - 9,0	7,0 - 8,0	7,0 - 8,0	7,0 - 8,0
Índice de Refracción (nD)	1,3385 - 1,3395	1,3385 - 1,3395	1,3370 - 1,3410	1,3385 - 1,3395	1,3385 - 1,3395
Osmolalidad (mOs/kg)	900 - 1040	900 - 1040	600 - 1200	900 - 1040	900 - 1040
NH ₃ /NH ₄ (mg/l)	0	0	0	0	0
NO ₂ (mg/l)	0	0	0	0	0
NO ₃ mg/l	120 - 160	120 - 160	120 - 160	120 - 160	120 - 160
PO ₄ (mg/l)	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0	2,5 - 5,0
Ca ²⁺ (mg/l)	400 - 480	400 - 480	400 - 480	400 - 480	400 - 480
CO ₃ ²⁻ (mg/l)	140 - 200	140 - 200	140 - 200	140 - 200	140 - 200
Gravedad Especifica (g/cm ³)	1,023 - 1,027	1,023 - 1,027	1,017 - 1,018	1,023 - 1,027	1,023 - 1,027
Ciclo de Iluminación (h/d)	**	**	**	**	**
Luz UVB (mW/cm ² a 302 nm)	0	0	0	1 o 2**	0

(continuación)

Rangos de Parámetros de Cultivo Usados para Acuarios de Control y Estresados					
Parámetro de Cultivo	Control	Estrés por Ozono	Estrés Osmótico	Estrés por UV	Estrés Hidrostático***
<p>Notas: *) La temperatura depende de la especie (para el alga marina, T = 12,5 °C; para algas verdes T = 25 °C)</p> <p>**) El ciclo de iluminación puede variar de 0 a 24 horas/día. Para el ciclo de luz del día, por lo general 12 horas/ día. Para iluminación UVB de 3 horas/día a 12 horas/día.</p> <p>***) El estrés hidrostático se produce cuando las algas, que por lo general crecen en aguas más profundas (3 m o más profundas), por ejemplo, el alga marina marrón gigante (<i>Macrocystis pirifera</i>), se transfieren y a continuación se cultivan en depósitos más superficiales (acuarios) con una presión hidrostática reducida en comparación con la que tienen en condiciones originales.</p>					

5 En una realización, los intervalos de los parámetros de cultivo usados para sistemas de control y de factores de estrés con alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) fueron los que siguen a continuación: Los tiempos de cultivo fueron 72 horas (3 días) o 96 horas (4 días). Control (Sin estrés): el alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) se cosechó a partir de condiciones de cultivo originales en aguas más profundas y se procesó sin transferencia a un acuario; el estrés por presión hidrostática solamente estaba en desarrollo durante los respectivos tiempos de cultivo; el estrés hidrostático se produce cuando las algas, que por lo general crecen en aguas más profundas (3 m o más profundas), por ejemplo, alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*), se transfieren y a continuación se cultivan en depósitos más superficiales (acuarios) con una presión hidrostática reducida en comparación con la que existe en condiciones originales; Estrés Hidrostático + Estrés por UV = 2 mW/cm² UVB 3-12 horas/día; Estrés Hidrostático + Estrés por Ozono = inyección continua de 100 mg/h; Estrés Hidrostático + Estrés Osmótico - osmolalidad de los medios de cultivo = 75 % del control. Los tiempos de cultivo fueron: 72 horas (3 días) o 96 horas (4 días).

15 En una realización, los intervalos de los parámetros de cultivo usados para sistemas de control y de factores de estrés con algas verdes (*Chaetomorpha linum*) que por lo general crecen en aguas superficiales y por lo tanto no experimentan estrés hidrostático en el experimento fueron los que siguen a continuación: Los tiempos de cultivo fueron 24 horas (1 día), 96 horas (4 días), 288 horas (12 días), 456 horas (19 días). Control (Sin estrés). Estrés por UV = 2 mW/cm² UVB 12 horas/día; Estrés por Ozono = inyección continua de 100 mg/h. Estrés Osmótico - osmolalidad de los medios de cultivo = 85 % del control.

Definiciones y Procedimientos

A continuación se establecen diversas definiciones de características que se pueden determinar mediante para las fracciones bioactivas de la presente invención, y procedimientos relacionados para la medición o análisis de estas características.

25 Tensión superficial

La tensión superficial se define como la fuerza a lo largo de una línea de unidad de longitud, en la que la fuerza es paralela a la superficie pero perpendicular a la línea. La tensión superficial se mide en fuerzas por unidad de longitud, su unidad en el de SI es N/m (Newtons por metro) (Pierre-Gilles de Gennes; Françoise Brochard-Wyart; David Quéré (2002). Capillary and Wetting Phenomena - Drops, Bubbles, Pearls, Waves. Springer. ISBN 0-387-00592-7; White, Harvey E. (1948). Modern College Physics. van Nostrand. ISBN 0442294018).

35 La tensión superficial está causada por la atracción entre las moléculas de líquido por diversas fuerzas intermoleculares. En la mayor parte del líquido, cada molécula se tira igualmente en todas las direcciones por las moléculas de líquido cercanas, dando como resultado una fuerza neta de cero. En la superficie del líquido, las moléculas se tiran hacia el interior por otras moléculas más profundas dentro del líquido y no son atraídas de forma tan intensa por las moléculas en el medio cercano (ya sea vacío, aire u otro líquido). Por lo tanto, todas las moléculas en la superficie están sujetas a una fuerza hacia dentro de atracción molecular que se equilibra solamente por la resistencia del líquido a la compresión, lo que significa que no hay fuerza hacia dentro neta. Sin embargo, hay una fuerza impulsora para disminuir el área superficial. Por lo tanto, el líquido por sí mismo se exprime en conjunto hasta que tenga el área superficial a nivel local más baja posible. Como resultado de la minimización del área superficial, una superficie asumirá la forma más lisa que pueda. Dado que cualquier curvatura en la forma de la superficie da como resultado un área más grande, también resultará una energía más elevada. En consecuencia, la superficie empujará hacia atrás frente a cualquier curvatura de la misma manera que una bola empujada hacia arriba empujará hacia atrás para minimizar su energía potencial gravitatoria.

45 Las mediciones de tensión superficial se realizaron usando un sistema de análisis de forma de gota Krüss EasyDrop con el software informático de ejecución unido Krüss DSA1 para control del dispositivo, adquisición de imágenes y análisis de imágenes de forma de gota. Se usaron jeringas desechables de 2 ml con agujas dosificadoras desechables con un diámetro de 1,8 mm para contener y dispensar las muestras, con jeringa nueva y aguja nueva

para cada material de muestra diferente. El procedimiento para realizar la medición se describe en el Software de Krüss para el Manual de usuario DSA1 v 1.91 para Análisis de Forma de Gota tal como se suministra con el sistema. La iluminación de la habitación se ajustó para eliminar la luz brillante y no difusa, evitando de ese modo reflexiones en la superficie de la gota. El sistema se encendió, con el sistema de luz de fondo ajustado a una intensidad de un 25 %, jeringa y aguja colocadas para que la imagen de la aguja tomara hasta ~10 % de la estructura. El foco se ajustó de una manera tan nítida que el software considera que es la máxima que se puede alcanzar. La región de interés se definió con una gota colgante de agua desionizada. El tipo de caída se estableció para la gota colgante. La magnitud de la imagen se leyó de acuerdo con el diámetro de la aguja. La densidad del medio de inmersión se introdujo como densidad del aire a temperatura ambiente a nivel del mar. Para la medición del control inicial se usó agua. Para el agua, y para cada material de muestra, se introdujo la densidad de la muestra y a continuación se determinó el volumen necesario para producir una gota colgante con una forma apropiada. Después de eso, la tensión superficial se midió en tres gotas colgantes, una gota reciente para cada medición. Para el cálculo se usó el ajuste de contorno de Young-Laplace. La media de las tres mediciones se consideró como la tensión superficial de un material de muestra dado.

15 **Osmolalidad**

La osmolalidad es la medida de la concentración de soluto, que se define como el número de osmoles de soluto por kg de solución. La osmolalidad mide el número de osmoles de partículas de soluto por unidad de masa de solución. La osmolalidad es distinta de la molaridad porque mide moles de partículas de soluto en lugar de moles de soluto. La distinción se debe a que algunos compuestos se pueden disociar en solución, mientras que otros no pueden. Los compuestos iónicos, tales como sales, se pueden disociar en solución en sus iones constituyentes, de modo que no existe una relación de uno a uno entre la molaridad y la osmolalidad de una solución. Por ejemplo, el cloruro sódico (NaCl) se disocia en iones Na^+ y Cl^- . Por lo tanto, para cada 1 mol de NaCl en solución, hay 2 osmoles de partículas de soluto (es decir, una solución 1 M de NaCl es una solución de 2 Osm de NaCl). Tanto los iones sodio como cloruro influyen en la presión osmótica de la solución. Los compuestos no iónicos no se disocian, y forman solamente 1 osmol de soluto por 1 mol de soluto. Por ejemplo, una solución 1 M de glucosa es 1 Osm (Widmaier, Eric P.; Hershel Raff, Kevin T. Strang (2008). Vander's Human Physiology, 11ª Ed. McGraw-Hill. pp. 108-112). Para determinar las osmolalidades de BAFSI se usó un osmómetro, modelo 3250 (Advanced Instruments, Inc). Este instrumento usa depresión del punto de congelación como principio de medición. El punto de congelación es una propiedad coligativa que depende de la presencia de partículas disueltas y de su número, pero no de su identidad. La depresión del punto de congelación sucede tanto cuando el soluto es un electrolito, tal como diversas sales, como un no electrolito, tal como carbohidratos.

Materia seca

La materia seca refleja la concentración de componentes no volátiles en BAFSI. Los niveles de materia seca se determinaron por comparación del peso de la muestra líquida con el peso de la materia seca residual después de haber evaporado los componentes líquidos. Se usaron platos de pesada de aluminio desechables (VWR 25433-016), balanza Ohaus Explorer E00640 (Ohaus Corporation) y horno, modelo 1400e de Shel Lab (VWR), ajustado a 105 °C. El porcentaje de materia seca se calcula como $(\text{'tara+ seca' - 'tara'}) / (\text{'tara+húmeda' - 'tara'}) * 100$.

Modificación Superficial de Vitro Skin (N-19) después de la Aplicación de BAFSI

Se usó una metodología de ensayo que usa mediciones del ángulo de contacto del agua para cuantificar los efectos de diversas sustancias en las propiedades de la superficie de un sustrato de piel ("Correlating Water Contact Angles and Moisturization/Sensory Claims" de Olga V. Dueva-Koganov y col., Cosmetics & Toiletries, enero de 2007, Vol. 122, N.º 1, pp. 20-27). Los datos presentados en este artículo muestran que las mediciones del ángulo de contacto se pueden usar para cuantificar y comparar los efectos de los productos para el cuidado de la piel en las propiedades de la superficie de este sustrato similar a la piel. Los productos que generan ángulos de contacto inferiores (inferiores a 80 grados) tienden a hacer reclamaciones más sensoriales relacionadas con la sensación ligera y no grasa, e hidratación a corto plazo, mientras que los productos que producen ángulos de contacto relativamente elevados tienden a hacer más reclamaciones relacionadas con la hidratación a largo plazo.

Los ángulos de contacto se midieron de acuerdo con el procedimiento de gota sécil usando el sistema de análisis de forma de gota Krüss EasyDrop con el software informático de ejecución unido Krüss DSA1 para control de dispositivo, adquisición de imágenes y análisis de imágenes de forma de gota (www.kruss.de/en/products/contact-angle/easydrop.html).

Como solución de sonda se usó agua desionizada y como sustrato Vitro Skin (N-19) de IMS, Inc. La dosis de aplicación de BAFSI de ensayo fue de 2 mg/cm^2 que es similar a la dosis de aplicación tópica de productos usados en diversos estudios de piel *in vivo*.

55 **Inhibición de elastasa**

La elastasa es una enzima que es capaz de degradar una serie de proteínas incluyendo a la elastina, una sustancia elástica en la piel que soporta su marco estructural. La elastasa está implicada en la inflamación, envejecimiento, fotoenvejecimiento, formación de arrugas de la piel, etc. La actividad inhibitoria de la elastasa se determinó mediante

un ensayo de colorimetría cinética adaptado para su uso con placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning 3641) de Corning Incorporated (Corning, NY) y lector de microplacas Synergy 2 de BioTek Instruments, Inc. (Winooski, VT). La actividad enzimática en la escisión del sustrato se indicaba mediante un desarrollo de color amarillo medido como aumento de la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm. La media de las tasas máximas de aumento de la absorbancia para los pocillos de control negativo se consideró como un 100 % de actividad enzimática, y la Cl_{50} se calculó como la concentración de la muestra en el pocillo necesaria para reducir la actividad enzimática a un 50 %. Los valores más bajos de Cl_{50} indican una inhibición más elevada de la actividad de elastasa. El sustrato N-Metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (EPC FH237), y la elastasa (EPC SE563) se obtuvieron en EPC (Elastin Products Company, Inc., Owensville, MO). El volumen de reacción en cada pocillo era de 200 μ l, con una concentración de elastasa igual a 0,87 unidades/ml, y sustrato igual a 363 μ M. Este procedimiento se adaptó a partir del procedimiento titulado "Assay con N-MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (EPC No. FH237) as substrate" a partir de la página 84 del Catálogo de Elastin Products Company, Inc. Research Biochemicals (2004, 92 páginas).

Inhibición de tripsina

La tripsina es una enzima proteolítica que está implicada en la proliferación e inflamación de la epidermis *in vivo*. La actividad de inhibición de la tripsina se determinó mediante ensayo de colorimetría cinética diseñado para su uso con placas de microtitulación de 96 pocillos (microplacas) y lector de microplacas controlado por ordenador. La actividad enzimática en la escisión del sustrato se indicaba mediante un desarrollo de color amarillo medido como aumento de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. La media de las tasas máximas de aumento de la absorbancia para los pocillos de control negativo se consideró como un 100 % de actividad enzimática, y la Cl_{50} se calculó como la concentración de la muestra en el pocillo necesaria para reducir la actividad enzimática a un 50 %. Los valores más bajos de Cl_{50} indican una inhibición más elevada de la actividad de tripsina. El sustrato de L-BAPA (clorhidrato de N α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida), tripsina, y reactivos de disolvente se obtuvieron en Sigma-Aldrich. Para preparar soluciones de trabajo de sustrato de tripsina y L-BAPA se usó tampón Tris-CaCl₂ a pH 8,2. Como disolvente para reactivos de tampón, como control negativo, y como los diluyentes para preparar diluciones en serie de las muestras usó agua desionizada. El volumen de reacción en cada pocillo era de 200 μ l, con una concentración de tripsina igual a 60 nM y sustrato igual a 0,5 mM.

Actividad antioxidante

El antioxidante es un agente que reduce el daño causado por la oxidación. La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo de ORAC usando una adaptación del procedimiento que se describe en "Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assays with Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader" Nota de Solicitud de BioTek disponible en (www.bi-otek.com/resources/docs/ORAC_Assay_Application_Note.pdf) para su uso con el lector de microplacas Synergy 2 de BioTek Instruments Inc (Winooski, VT). En este ensayo, AAPH (2,2'-azobis 2-amino-propano) genera especies reactivas del oxígeno que dañan la sonda fluorescente (fluoresceína sódica). Los antioxidantes, tales como (R)-Trolox metil éter previenen o ralentizan este daño, y sus efectos se pueden cuantificar con mediciones de fluorescencia. Las lecturas de fluorescencia se tomaron con longitud de onda de excitación establecida en 485 nm y longitud de onda de emisión establecida en 528 nm, con un volumen de reacción de 200 μ l, concentración de AAPH de 55 mM, concentración de fluoresceína sódica de 1,33 μ M, el intervalo de concentración de (R)-Trolox metil éter entre 80 μ M y 2 μ M. La fluoresceína sódica (Fluka 46960), AAPH (Sigma 440914) y (R)-Trolox metil éter (Fluka 93509) se obtuvieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los valores de AUC (Área Bajo la Curva) se calcularon como la suma de las proporciones (lectura de fluorescencia real para el pocillo dividida entre la primera lectura de fluorescencia para el pocillo). El promedio de los valores de AUC de los pocillos con agua desionizada se restó del AUC de los pocillos con (R)-Trolox metil éter y los pocillos con artículos de ensayo para obtener la AUC correspondiente a la conservación de fluorescencia por antioxidantes. Una curva de calibración se generó como función de un AUC relacionado con antioxidante de los pocillos que muestran actividad de ORAC equivalente en peso de (R)-Trolox metil éter. A continuación, la actividad de ORAC para los artículos de ensayo se calculó como unidades de peso del artículo de ensayo necesarias para conseguir un efecto antioxidante igual al producido por 1 unidad de peso de (R)-Trolox metil éter, con los números más bajos indicando una actividad de ORAC más elevada.

Actividad de neutralización de radicales libres de DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

El neutralizador de radicales libres es un ingrediente que reacciona con los radicales libres en un sistema biológico, reduce el inducido por radicales libres y protege frente a los efectos de los radicales libres. La actividad de neutralización de radicales libres, es decir, la actividad de neutralización de radicales libres de DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), se determinó mediante un ensayo de colorimetría cinética adaptado para su uso con placas de microtitulación de 96 pocillos de polipropileno revestidas con vidrio (número de catálogo 400 062) de SUN-SRi (Rockwood, TN) y el lector de microplacas Synergy 2 de BioTek Instruments Inc (Winooski, VT). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 515 nm. El volumen de reacción en cada pocillo de la microplaca era de 200 μ l, con una concentración inicial de DPPH iguala a 114 μ M. Como control positivo se usó ácido L-ascórbico. DPPH (Sigma D9132) y el ácido L-ascórbico de USP (Sigma A-2218) se obtuvieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La estequiometría de la reacción se calculó y se expresó como unidades de peso del artículo de ensayo necesarias para inactivar 1 unidad de peso de DPPH, con los números más bajos indicando una actividad más elevada. Este procedimiento se adaptó a partir del procedimiento que se describe en " Use of a free radical method to evaluate

antioxidant activity" de W. Brand-Williams y col., publicado en LWT - Food Science and Technology, Volumen 28, Artículo 1, 1995, pp 25-30.

Color (Escala de Gardner)

5 La escala de Color de Gardner, tal como se especifica en la norma ASTM D1544, es una escala de colores de un solo número para clasificar las muestras que transmiten luz con características de color que varía co de amarillo claro a rojo amarronado. La escala se define por las cromaticidades de patrones de vidrio numerados de 1 para los más claros a 18 para el más oscuro. El Color de Gardner de las muestras se determinó en el Lovibond Gardner Comparator 3000 (The Tintometer Limited of Salisbury, UK), un instrumento de 3 campos para determinar visualmente el Color de Gardner de las muestras por comparación directa con los patrones de vidrio coloreado.

10 Índice de refracción, nD

El índice de refracción se determinó con la medición en el refractómetro Arias 500 de Reichert Analytical Instruments (Depew, NY) con regulación de temperatura proporcionada por el modelo 12108-10 de controlador de temperatura Polystat de Cole-Parmer (Vernon Hills, Illinois). El procedimiento se basa en el manual de instrucciones para el refractómetro Arias 500, secciones 6.0, 4.1 y 4.4-4.5.

15 Determinación del pH

El pH se define como el logaritmo decimal negativo de la actividad del ión hidrógeno en una solución y se usa para determinar la acidez o la basicidad de una solución.

Los niveles de pH se determinaron en un medidor de pH, Modelo 250 pH / ISE / medidor de conductividad de éter de Denver Instrument Company (Bohemia, NY) con número 300729.1 de electrodo de pH / ATC (Denver Instrument Company). El procedimiento se basa en el manual de Rev. D 301127.1 de Denver Instrument Company, páginas ii y 9 - 12.

20 Determinación de la longitud de onda de Absorbancia máxima en el espectro UV ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)

25 $\lambda_{\text{máx}}$, nm se determinó en el espectrofotómetro de pro UV / Visible Ultrospec 4300 de Biochrom Ltd (Cambridge, UK), anteriormente bajo GE Healthcare, conocido anteriormente como conocido como Amersham Biosciences, con soporte de celda calentada con agua (parte n.º 80-2106-08 de Amersham). El procedimiento se basa en las secciones 2 y 4 del número 80-2108-25 del manual de Amersham con el título SWIFT II Applications Software UV/Visible Spectrophotometers, y en las páginas 7 y 15 del manual de Amersham con el número 80-2111-79 titulado Manual del Usuario del Espectrofotómetro pro UV/Visible Ultrospec 4300. El control del instrumento fue proporcionado por el paquete de software SWIFT II (Biochrom Ltd) y la regulación de la temperatura por el Mini Circulador CB20 de Torrey Pines Scientific (Carlsbad, CA).

30 Determinación de Proteína

El procedimiento de Kjeldahl se usó para medir el contenido de nitrógeno proteico.

Límites Microbiológicos

35 Contenido microbiano y límites: Recuento Plaquetario Total, CFU/g; Moho y Levadura, CFU/g; *E. coli*; *Salmonella sp.*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas sp.* se determinaron de acuerdo con la farmacopea de Estados Unidos XXX, NF25, <61>, Ensayos de Límite Microbiológico.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar realizaciones en particular de la presente invención, pero en modo alguno pretenden limitar el alcance de la presente invención.

40 Ejemplo 1

procedimiento para preparar las BAFSI de la presente invención

En general, el procedimiento para preparar las composiciones bioactivas de la presente invención se describe en el documento de patente de Estados Unidos n.º 7.442.391. Dependiendo del organismo fotosintético específico, los regímenes de este procedimiento se pueden modificar adicionalmente. Los organismos fotosintéticos se someten a diversos factores de estrés, se cosechan, se recogen, y se lavan para producir biomasa recién obtenida.

45 Esta biomasa recién obtenida se somete a molienda, maceración, y prensado. La biomasa se muele a 3.000 rpm durante 30 segundos. La biomasa molida se prensa inmediatamente usando una prensa de tornillo continua horizontal (Prensa Compacta "CP-6", Vincent Corporation, FL). La presión en el cono se mantiene a un nivel de 24 kg/cm², la velocidad del tornillo a 12 rpm, y el aumento de temperatura es ≤ 5 °C. Como resultado, el jugo celular se separa de forma eficaz de la fracción de la pared celular. A continuación el jugo celular se filtra a través de una malla

de nailon para producir jugo celular vegetal filtrado.

La separación de la fitomasa recién obtenida con respecto a la fracción de la pared celular y jugo intracelular de la célula va seguido de fraccionamientos de jugo celular realizados para producir BAFSI de núcleo: fracciones de membrana y de suero.

- 5 El jugo celular filtrado se exponía tratamiento con microondas para coagular el jugo celular. El jugo celular coagulado se enfría y a continuación se somete a centrifugación o ultracentrifugación para producir fracción de membrana y sobrenadante de jugo celular.

La fracción de membrana de BAFSI se usa para preparar composiciones para el cuidado de la piel, cuidado solar, cuidado del cabello, y cuidado personal que contienen fracción de membrana de BAFSI.

- 10 El sobrenadante del jugo celular "como tal" se puede considerar también BAFSI adecuada y se puede usar como ingrediente bioactivo.

Además, el sobrenadante del jugo celular se puede usar para preparar composiciones para el cuidado de la piel, cuidado solar, cuidado del cabello, y cuidado personal que contienen BAFSI.

- 15 Dependiendo de los organismos marinos, el sobrenadante del jugo celular se puede someter adicionalmente a refinado de suero celular para producir ingredientes cosméticos estables y activos. Esto se consigue retirando del suero celular los componentes principales responsables de las transformaciones irreversibles que conducen a generación de precipitado no deseado y deterioro del color y del olor. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a: ajuste del pH, precipitación isoeléctrica, tratamiento con microondas, tratamiento térmico, enfriamiento, centrifugación, filtrado a vacío y estabilización.

- 20 La precipitación isoeléctrica se usa para producir una mezcla que contiene fracción de citoplasma y fracción de suero celular. A continuación, la fracción de suero celular se somete a tratamiento con microondas para provocar la coagulación. Con el fin de separar la fracción de suero celular de la fracción de citoplasma, la mezcla se somete a centrifugación. Dependiendo de la fuente vegetal, antes del tratamiento de microondas, se puede ajustar el pH de la fracción de suero celular. Después de coagulación, la mezcla se enfría a continuación seguido filtración o centrifugación para producir el filtrado de suero celular. Se debería indicar que este procedimiento se debe usar inmediatamente después de que se haya completado la separación del suero celular de la fracción de citoplasma. Los criterios cuantitativos para evaluar la separación completa de la fracción de citoplasma son la ausencia de niveles detectables de proteínas de alto peso molecular (por ejemplo, ausencia de la ribulosa bifosfato carboxilasa) en el filtrado o sobrenadante posterior. Como un ejemplo, los sobrenadantes del jugo celular precipitado se pueden separar en una centrifugadora refrigerada durante un periodo superior o igual a 20 minutos a rpm superior o igual a 3000 rpm, y se consigue una ausencia de las proteínas que tienen un peso molecular superior o igual a 10.000 en el suero celular.

A continuación, el filtrado de suero celular se estabiliza con estabilizantes s, conservantes, agentes quelantes y antioxidantes para producir BAFSI derivadas de suero celular.

- 35 Los conservantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, sorbato potásico, benzoato sódico, metil parabeno sódico, y ácido cítrico. Los estabilizantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, pentilenglicol, etilhexilglicerina. Los agentes quelantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, EDTA tetrasódico, EDTA disódico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico. Un ejemplo de un antioxidante adecuado para su uso en la presente invención es el metabisulfito sódico.

- 40 Las BAFSI se capturan y se aíslan a través de tecnologías de fraccionamiento de plantas recién obtenidas y son muy adecuadas para su uso en formulaciones y aplicaciones para cuidado de la piel, protección solar, cuidado del cabello y cuidado personal que comprenden al menos una BAFSI y otros ingredientes y agentes activos cosméticamente aceptables.

- 45 La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar las composiciones para el cuidado de la piel, cuidado solar, cuidado del cabello, y cuidado personal que contienen BAFSI que presentan una combinación óptima de las propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas útiles que incluyen, pero no se limitan a, actividades antioxidantes y de neutralización de radicales libres; inhibición de enzimas asociadas con la inflamación de la piel, envejecimiento de la piel y daño ambiental, protección de la piel y reparación de tejidos humanos.

- 50 Las BAFSI estabilizadas demuestran propiedades que satisfacen totalmente todos los requisitos de los ingredientes cosméticos. Los estudios de estabilidad indican que los ingredientes cosméticos producidos a partir de suero celular a través de estos procedimientos son estables a temperatura ambiente durante 12-24 meses (es decir, mantienen la integridad y actividades fisicoquímicas).

Ejemplo 2**Preparación de fracciones de suero de BAFSI de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*)**

Se cosecharon brotes de *Macrocystis pirifera* con una variación de tamaño de 15 cm a 60 cm de longitud en el suelo del océano del sur de California. Los brotes se embolsaron inmediatamente después de su recogida con seis a siete brotes por bolsa en aguas del océano, se empaquetaron en refrigeradores con paquetes de hielo en gel y se transportaron para entregar al día siguiente en el laboratorio de Ossining, N.Y. El alga marina se puso en los acuarios dentro de los treinta minutos de entrega y se dejó que se aclimataron en acuarios en circulación.

Se prepararon cuatro acuarios de 150 litros idénticos antes de cada envío para imitar las condiciones del océano en el entorno natural de alga marina. Treinta y cinco (35) gramos por litro de sal marina artificial de Calidad Científica, Coralife, se mezclaron con agua desionizada y se hizo circular a través de los acuarios. A cada acuario se añadieron veinticinco mililitros de alimento para algas Proline F/2 de la Parte A y de la Parte B.

Los intervalos de parámetros de cultivo usados para los sistemas de control y de factores de estrés con alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) fueron: Control (Sin estrés): alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) cosechada a partir de condiciones de cultivo originales en agua más profunda y se procesaron; el estrés por presión hidrostática solo estaba en desarrollo durante todos los respectivos tiempos de cultivo; Los tiempos de cultivo fueron: 72 horas (3 días) o 96 horas (4 días). El estrés hidrostático se produce cuando las algas, que por lo general crecen en aguas más profundas (3 m o más profundas), por ejemplo, alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*), se transfieren y a continuación se cultivan en depósitos más superficiales (acuarios) con una reducción de la presión hidrostática en comparación con la existente en las condiciones de cultivo originales; Estrés Hidrostático + Estrés por UV = 2 mW/cm² UVB 3-12 horas/día; Estrés Hidrostático + Estrés por Ozono = inyección continua de 100 mg/h; Estrés Hidrostático + Estrés Osmótico - osmolalidad de los medios de cultivo = 75 % del control.

La descripción del equipo de cultivo y los componentes del sistema de control y los intervalos de parámetros de cultivo usados en los acuarios se describen en la **Tabla 1** y en la **Tabla 2**, respectivamente.

Las muestras de biomasa de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) se tomaron después de su entrega y se retiraron de los acuarios de cultivo en momentos de cultivo específicos: 72 horas (3 días), 96 horas (4 días). Después de cortar y descartar los discos adhesivos, las siguientes partes de estas macroalgas: hojas, neumatocistos y estipes se recogieron, se aclararon y se colocaron en el receptáculo del Molino de Cuchillas Grindomix GM 200 (Retsch, Alemania) con cuchillas de acero inoxidable y tapa de gravedad y se molieron durante 30 segundos a 3000 RPM.

A continuación, la biomasa molida se prensó inmediatamente una prensa de tornillo continuo, horizontal (Prensa Compacta "CP-6", Vincent Corporation, FL). La presión en el cono se mantuvo nivel de 24 kg/cm², la velocidad del tornillo estaba a 12 rpm, y el aumento de temperatura era ≤ 5 °C. Como resultado, la fracción de la pared celular se separó de forma eficaz del jugo celular que se usó para fraccionamiento adicional.

El pH inicial del jugo celular era de 6,50 a 7,30. El pH se ajustó a aproximadamente 4,0 y se sometió a tratamiento con microondas a aproximadamente 194 °F (90 °C) durante aproximadamente 30 s, se enfrió a aproximadamente 30 °C, se centrifugó y se separó en una centrifugadora refrigerada durante un periodo superior o igual a 45 minutos a superior o igual a 4.000 g.

Se usó la siguiente composición de conservantes y estabilizantes: sorbato potásico al 0,1 %; benzoato sódico al 0,1 %; metabisulfito sódico al 0,1 %, EDTA tetrasódico (Dissolvine 220S) al 0,1 % y pentilenglicol (Hydrolite 5) al 1,9 %.

Ejemplo 3**Especificaciones del Producto de fracciones de suero de BAFSI****de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*)**

Las BAFSI de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) se preparó de acuerdo con el procedimiento que se ha descrito anteriormente en el **Ejemplo 2**.

Se realizaron análisis de las BAFSI de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) para determinar sus características fisicoquímicas y microbianas presentadas en la **Tabla 3**.

Tabla 3

Características físicas, químicas y organolépticas de BAFSI de alga marina marrón gigante (<i>Macrocystis pirifera</i>)	
Características	Descripción /Rango
Aspecto	Líquido de Color Amarillo Dorado de Transparente a Ligeramente Turbio
Olor	Característica Ligera
Solubilidad en agua	Soluble en cualquier proporción
Color (escala de Gardner)	1 - 3
Materia seca (%)	3,89 - 4,91
Índice de refracción (nD)	1,335 - 1,341
pH	3,7 - 4,2
Absorbancia (1:20 en Agua DI) a 280 nm	0,25 - 0,65
Recuento Plaquetario Total (CFU / g)	< 10
Moho / Levadura (CFU / g)	< 10
<i>E. coli</i> (CFU / g)	Negativo / 10 g
<i>Salmonella</i> sp. (CFU / g)	Negativo / 10 g
<i>Staphylococcus aureus</i> (CFU / g)	Negativo / 10 g
<i>Pseudomonas</i> sp. (CFU / g)	Negativo / 10 g

5 Se determinó que las fracciones de suero de BAFSI de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) eran sustancialmente libres de proteínas (menos de un 0,027 % de determinarlas con el procedimiento de Kjeldahl), estables (es decir, mantenían la integridad física y química) durante al menos 12-18 meses mientras se almacenaban a una temperatura entre 15 y 25 °C en recipientes cerrados protegidos de la luz. La BAFSI de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) es un producto biodegradable.

Ejemplo 4

10 Efectos de modulación de factores de estrés en las propiedades de fracciones de suero de BAFSI de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*)

Se analizaron BAFSI de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) para determinar el impacto de diversos factores de estrés en sus propiedades fisicoquímicas (tensión superficial; propiedades de modificación de superficie; materia seca; osmolalidad) y actividades biológicas usando ensayos de inhibición enzimática, antioxidantes, y neutralización de radicales libres. Los resultados se presentan en las **FIGS. 3-10** y se resumen en la **Tabla 4**.

15

Tabla 4

BAFSI de <i>Macrocyctis pirifera</i> , % de diferencia a partir del control (Sin estrés)									
Factores de Estrés	Días de Estrés	Materia Seca	Osmolalidad	Osmolalidad por porcentaje de contenido en peso seco	Tensión Superficial	Angulo de contacto con el Agua en Vitro Skin (disminución = modificación hidrófila)	DPPH Inactivación (aumento = eficacia menor)	Cl ₅₀ de Inhibición de Elastasa (disminución = eficacia mayor)	Cl ₅₀ de Inhibición de Tripsina (disminución = eficacia mayor)
Control (Sin Estrés) MEDIDA INICIAL	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Solo estrés hidrostático	3	0,00	0,36	0,35	-2,73	No Sometido a Ensayo	No Sometido a Ensayo	-20,54	-10,29
	4	0,00	1,78	1,79	-4,26	-2,00	15,94	-50,20	13,00
Estrés Hidrostático + UVB Estrés 3 horas / día	3	-13,85	-10,30	4,14	-2,92	No Sometido a Ensayo	No Sometido a Ensayo	-8,85	-3,27
Estrés Hidrostático + UVB Estrés 12 horas / día	4	-18,94	-10,21	10,78	-4,34	-21,00	536,86	-46,52	-16,94
Estrés Hidrostático + Estrés Osmótico	4	-22,20	-20,87	-20,70	-0,59	-2,90	34,80	-47,85	-8,20
Estrés Hidrostático + Estrés por Ozono	4	-0,20	-10,57	14,96	-10,01	-9,10	127,99	-47,31	57,37

Los factores de estrés tienen efectos de modulación en las respectivas propiedades fisicoquímicas (tensión superficial; propiedades de modificación de superficie; materia seca; osmolalidad) de BAFSI de algas marinas, como se pone en evidencia por la variación (por ejemplo, disminución) de la materia seca. Además, el estrés osmótico da como resultado un contenido de materia seca más bajo, que se puede explicar mediante mecanismos de emparejamiento con presión osmótica menor (**FIG. 3**).

La osmolalidad sigue un patrón en cierto modo similar al de la materia seca (**FIG. 4**).

Sin embargo, cuando se compara con el número de partículas generadas por la misma cantidad de contenido de materia seca, las diferencias son más reveladoras, en especial para las algas marinas estresadas de forma osmótica.

Se podría dar el caso de que los componentes celulares de las algas marinas se hubieran unido a un número de partículas más elevado, disminuyendo la osmolalidad relativa adicionalmente, o que partículas relativamente pequeñas tales como moléculas e iones de peso molecular menor se hubieran transportado fuera de las células (**FIG. 5**).

La tensión superficial depende de la concentración y naturaleza de los solutos y varía dependiendo del factor o factores de estrés aplicados y de forma simultánea ayuda a evaluar los cambios de composición debidos a factores de estrés (**FIG. 6**).

Los factores de estrés son capaces de alterar las capacidades de modificación de superficie de las fracciones de suero resultante. Por ejemplo, si un estrés hidrostático se combina con ciertos factores de estrés por UVB, se podrían producir fracciones de suero de BAFSI capaces de producir ángulos de contacto menores. Por lo tanto, los productos para el cuidado de la piel producidos con las mismas podrían tener una mejora de las propiedades de sensación en la piel e hidratantes (**FIG. 7**).

Las mediciones de inactivación de radicales libres tal como se miden con el ensayo de DPPH muestran que todos los factores de estrés dan como resultado una capacidad menor; radicalmente menor en el caso del estrés hidrostático combinado con el estrés por UVB. Una posible razón podría ser que a una intensidad dada de exposición a UVB y una duración total, muchos de los factores de inactivación de radicales libres disponibles y producidos se han agotado (**FIG. 8**).

Los factores de estrés aplicados, factores de estrés hidrostático solos y combinados con factores de estrés osmótico, por ozono y por UV aumentan la actividad de inhibición de la elastasa, algunos de forma muy significativa (**FIG. 9**).

Los factores de estrés pueden inducir cambios en actividades más específicas, tales como aumento de la actividad de inhibición por tripsina en el caso del estrés hidrostático combinado con cierto estrés por UVB y la reducción de esta actividad bajo otros factores de estrés (**FIG. 10**).

El aumento de la actividad de inhibición de elastasa y tripsina de las seleccionadas BAFSI de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) indica una mejora de sus propiedades antiinflamatorias y antienvjecimiento.

Ejemplo 5

35 Comparación de la inhibición de elastasa por fracciones de suero de BAFSI de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*) con respecto a la inhibición de elastasa por alginato

Se sabe que los alginatos son capaces de reducir la actividad de elastasa, conduciendo a su uso en aplicaciones tales como apósitos para heridas en los que se desean propiedades antiinflamatorias (Influence of alginate and alginate containing silver on elastase and ROS activity *in vitro*, C. Wiegand y col., Congreso Anual de ETRS 13.09.-16.09.2006, Pisa/ Italia).

La materia seca de las hojas de algas marinas contiene un 17 %-25 % de alginatos en peso (Monthly Determination of Alginate, M/G Ratio, Mannitol, and Minerals in Cultivated *Laminaria japonica*, Masura Honya y col., Nippon Suisan Gakkaishi, 59 (2), pp 295-299, 1993).

Para comprobar la contribución del alginato a la actividad inhibitoria de la elastasa de BAFSI de las algas marinas, una muestra de alginato sódico (sal sódica del ácido alginico, de algas marrones, A2158) se obtuvo en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Una solución de alginato sódico en agua desionizada, 0,2 % en p/p se preparó por agitación y sonicación. Una serie de diluciones de esta solución se sometió ensayo junto con series de diluciones de dos fracciones diferentes de suero de BAFSI de algas marinas de acuerdo con el procedimiento para determinar la inhibición de elastasa como se ha definido anteriormente.

Se determinó que la CI_{50} de la elastasa de alginato sódico era 0,0075 mg/ml. En el mismo ensayo, se determinó que la CI_{50} de la materia seca de BAFSI de algas marinas era 0,0012 mg/ml para una fracción de suero y 0,0009 mg/ml para otra fracción de suero. T esto también se corresponderían con los valores mostrados para la CI_{50} de elastasa de BAFSI de algas marinas en la **FIG. 9**.

La diferencia demostrada es significativa incluso con la suposición improbable de que la materia seca de la fracción de suero de BAFSI de algas marinas está formada por un 100 % de alginato. Si se tiene en cuenta el nivel de alginato más probable como se ha mencionado anteriormente, la diferencia es radical.

- 5 Por lo tanto, la actividad inhibitoria de la elastasa de materia seca de fracciones de suero de BAFSI de algas marinas es mayor que la del alginato sódico puro, lo que se puede explicar por la contribución de otros componentes más potentes que el alginato en la inhibición de la elastasa.

Ejemplo 6

Estabilidad térmica de la actividad inhibitoria de elastasa de fracciones de suero de BAFSI seleccionadas de alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*)

- 10 La estabilidad térmica de la actividad inhibitoria de la elastasa de la fracción seleccionada de suero de BAFSI de algas marinas se sometió ensayo tomando tres alícuotas idénticas de la misma fracción de suero, almacenándolas en recipientes idénticos a diferentes temperaturas durante 6 días y determinando su inhibición de actividad de elastasa de acuerdo con el procedimiento que se ha descrito anteriormente.

- 15 La CI_{50} de la elastasa de la muestra almacenada a 4 °C era 0,0012 mg/ml, la CI_{50} de la muestra almacenada a 60 °C era 0,0012 mg/ml, y la CI_{50} de la muestra almacenada a 80 °C era 0,0011 mg/ml.

Por lo tanto, la actividad inhibitoria de la elastasa de fracciones de suero de BAFSI de algas marinas puede permanecer estable después de su exposición a temperaturas elevadas usadas por lo general en estudios de estabilidad térmica y de envejecimiento acelerado.

Ejemplo 7

- 20 **Preparación de fracciones de suero de BAFSI de algas verdes (*Chaetomorpha linum*)**

Las algas verdes (*Chaetomorpha linum*) se conocen por su tasa de crecimiento rápido, capacidad para sobrevivir a temperaturas relativamente elevadas y demuestran niveles más elevados de actividad fotosintética cuando se comparan con las algas marinas gigantes.

- 25 Las algas verdes se cultivaron en agua (Live Aquaria.com Aquaculture Coral & Marine Life Facility, CA.). Se cosecharon, se embolsaron y se transportaron para entregar al día siguiente en el laboratorio de Ossining, N.Y. El alga verde se retiró de las bolsas de transporte. Una porción de Biomasa se tomó y se procesó para la muestra de Día de Control 0. Se tomó una parte del alga verde y se colocó en los cuatro acuarios todos con una temperatura del agua de aproximadamente 25,0 grados C., dentro de los treinta minutos de entrega.

- 30 Los intervalos de los parámetros de cultivo usados para los sistemas de control y de factores de estrés con algas verdes (*Chaetomorpha linum*) fueron: Control; Estrés por UV = 2 mW/cm² UVB 12 horas/día; Estrés por Ozono = 100 mg/h de inyección continua; Estrés Osmótico - osmolalidad de los medios de cultivo = 85 % del control; Tiempo de cultivo: 24 horas (1 día), 96 horas (4 días), 288 horas (12 días), 456 horas (19 días).

La descripción del equipo de cultivo y los componentes del sistema de control y los intervalos de parámetros de cultivo usados en los acuarios se describen en la **Tabla 1** y en la **Tabla 2**, respectivamente.

- 35 Las muestras de biomasa de algas verdes (*Chaetomorpha linum*) se retiraron de los acuarios de cultivo en momentos de cultivo específicos: 0 horas, 24 horas (1 día), 96 horas (4 días), 288 horas (12 días), 456 horas (19 días), se aclararon y se colocaron en el receptáculo del Molino de Cuchillas Grindomix GM 200 (Retsch, Alemania) con cuchillas de acero inoxidable y tapa de gravedad. Las algas verdes se molieron durante 30 segundos a 3000 rpm.

- 40 A continuación, la biomasa molida se prensó inmediatamente una prensa de tornillo continuo, horizontal (Prensa Compacta "CP-6", Vincent Corporation, FL). La presión en el cono se mantuvo nivel de 24 kg/cm², la velocidad del tornillo estaba a 12 rpm, y el aumento de temperatura era ≤ 5 °C. Como resultado, la fracción de la pared celular se separó de forma eficaz del jugo celular que se usó para fraccionamiento adicional.

El pH inicial del jugo celular variaba de 6,30 a 7,90.

- 45 El pH se ajustó a aproximadamente 4,0 y se sometió a tratamiento con microondas a aproximadamente 194 °F (90 °C) durante aproximadamente 30 s, se enfrió a aproximadamente 30 °C, se centrifugó y se separó en una centrifugadora refrigerada durante un periodo superior o igual a 45 minutos a superior o igual a 4.000 g.

- 50 Se usó la siguiente composición de conservantes y estabilizantes: sorbato potásico al 0,1 %; benzoato sódico al 0,1 %; metabisulfito sódico al 0,1 %, EDTA tetrasódico (Dissolvine 220S) al 0,1 % y pentilenglicol (Hydrolite 5) al 1,9 %.

Ejemplo 8**Especificaciones del producto de fracciones de suero de BAFSI de algas verdes (*Chaetomorpha linum*)**

5 Se prepararon BAFSI de algas verdes (*Chaetomorpha linum*) de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el **Ejemplo 7**. Se realizaron un análisis de algas verdes (*Chaetomorpha linum*) para determinar sus características fisicoquímicas y microbianas.

La **Tabla 5** resume las propiedades físicas y químicas y organolépticas de BAFSI (fracción de suero) de algas verdes (*Chaetomorpha linum*).

Tabla 5

Características físicas, químicas y organolépticas de BAFSI (fracción de suero) de algas verdes (<i>Chaetomorpha linum</i>)	
Características	Descripción/Rango
Aspecto	Líquido de Color Amarillo Dorado de Transparente a Ligeramente Turbio
Olor	Característica Ligera
Solubilidad en agua	Soluble en cualquier proporción
Color (escala de Gardner)	1 - 3
Materia seca (%)	3,20 - 6,30
pH	3,7 - 4,2
Recuento Plaquetario Total (CFU / g)	< 10
Moho / Levadura (CFU / g)	< 10
<i>E. coli</i> (CFU / g)	Negativo / 10 g
<i>Salmonella</i> sp. (CFU / g)	Negativo / 10 g
<i>Staphylococcus aureus</i> (CFU / g)	Negativo / 10 g
<i>Pseudomonas</i> sp. (CFU / g)	Negativo / 10 g

10 Se determinó que las BAFSI de algas verdes (*Chaetomorpha linum*) eran estables (es decir, mantenían la integridad física y química) durante al menos 12-18 meses mientras se almacenaban a una temperatura entre 15 y 25 °C en un recipiente cerrado protegido de la luz. Las BAFSI de algas verdes (*Chaetomorpha linum*) es un producto biodegradable.

Ejemplo 9

15 **Efectos de modulación de factores de estrés en las propiedades de fracciones de suero de BAFSI de algas verdes (*Chaetomorpha linum*)**

20 Se analizaron BAFSI de algas verdes (*Chaetomorpha linum*) para determinar el impacto de diversos factores de estrés en sus propiedades fisicoquímicas (tensión superficial; materia seca; osmolalidad) y actividades biológicas usando ensayos de inhibición enzimática y antioxidantes. Las diferencias relativas de los controles se presentan en las **FIGS. 11-16** y se resumen en la **Tabla 6**.

Tabla 6

BAFSI de <i>Chaetomorpha linum</i> , % de diferencia del control para el día respectivo							
Factores de Estrés	Días de Estrés	Materia Seca	Osmolalidad	Osmolalidad por porcentaje del contenido de peso seco	Tensión superficial	Cl ₅₀ de Elastasa (números menores = eficacia mayor)	ORAC (números menores = eficacia mayor)
UVB	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	3,41	-0,41	-3,69	-0,07	2,52	-19,13
	4	27,31	55,27	21,97	3,70	-45,13	8,95
	12	-3,48	3,25	6,97	3,02	-24,29	-42,71
	19	2,93	34,59	30,76	19,56	-76,39	-34,91
Ozono	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	-1,91	-8,68	-6,90	7,55	-30,33	-0,86
	4	25,24	32,66	5,92	8,12	-38,29	11,12
	12	-6,98	-9,25	-2,44	-5,62	-20,99	-9,12
	19	-8,04	-7,67	0,40	0,08	1,18	0,25
Osmótico	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	-1,41	-2,90	-1,51	-0,88	8,64	-3,72
	4	52,63	57,05	2,90	9,56	-34,55	45,17
	12	-40,33	-43,66	-5,59	-1,03	117,38	-3,84
	19	30,05	30,96	0,70	-0,40	-60,24	14,80

5 Al igual que con las macroalgas (algas marinas), los factores de estrés también modulan la productividad (niveles de materia seca) de las algas verdes. Los cambios en el contenido de materia seca de los artículos de ensayo mostrados como porcentaje de diferencia a partir de la muestra de control tomada el mismo día son particularmente radicales para *Chaetomorpha linum* estresadas de forma osmótica (**FIG. 11**).

10 Al igual que con las algas marinas, la osmolalidad de fracciones de suero de BAFSI de *Chaetomorpha linum* sigue el patrón similar que el contenido de materia seca (**FIG. 12**). A diferencia de las algas marinas, en número de partículas generadas por un peso dado que fracciones de suero de BAFSI de materia seca de algas verdes no fluctúa demasiado con excepción de las algas verdes estresadas por UVB. Esto puede indicar un mecanismo diferente de adaptación al estrés para las algas verdes (*Chaetomorpha linum*) con respecto a las macroalgas (*Macrocystis pirifera*) (**FIG. 13**).

Los factores de estrés breve, independientemente de su naturaleza, aumentan la capacidad de las fracciones de suero para inhibir la elastasa, especialmente para *Chaetomorpha linum* estresadas por UVB y por ozono (**FIG. 14**).

15 Los factores de estrés modulan la tensión superficial de todas las fracciones de suero de BAFSI de *Chaetomorpha linum*. Los periodos de duración mayores muestran una divergencia significativa (**FIG. 15**)

El estrés por UVB aumenta la Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno de la fracción de suero de BAFSI de *Chaetomorpha linum* (**FIG. 16**).

Ejemplo 10

20 Loción cutánea

Composición

ES 2 609 785 T3

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporciona)			
Parte A						
Arlacel 165 V	Estearato de Glicerilo (y) Estearato de PEG-100	Uniqema	1,80	1,80	1,80	1,80
Tegosoft TN	Benzoato de Alquilo C12-15	Degussa	5,00	5,00	5,00	5,00
Dermofeel BGC	Dicaprilato/Dicaprato de Butilenglicol	Dr. Straetmans	5,00	5,00	5,00	5,00
Tegosoft P	Palmitato de Isopropilo	Degussa	2,00	2,00	2,00	2,00
Lanette O	Alcohol Cetearílico	Cognis	1,50	1,50	1,50	1,50
Neo Heliopan 303	Octocrileno	Symrise	5,00	5,00	5,00	5,00
Parsol 1789	Butil Metoxidibenzoilmetano*	DSM	2,50	2,50	2,50	2,50
TINOSORB® S	Bis-Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina*	BASF	1,70	1,70	1,70	1,70
Parte B						
Agua	Agua		cs para un 100 %	cs para un 100 %	cs para un 100 %	cs para un 100 %
Propilenglicol	Propilenglicol	Rita Corporation	2,00	2,00	2,00	2,00
	BAFSI Ejemplo 2 o 7**	IBT, LLC	0,10	1,00	2,00	5,00
Dissolvine NA-2-P	EDTA Disódico	Akzo Nobel	0,20	0,20	0,20	0,20
Amphisol K	Fosfato de Cetilo y Potasio	DSM	2,50	2,50	2,50	2,50
Parte C						
Eusolex 232	Ácido Fenilbenzoimidazol Sulfónico *	Merck	1,50	1,50	1,50	1,50
Agua	Agua		3,75	3,75	3,75	3,75
Tris Amino	Trometamina	Angus	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.
Parte D						
SALCARE® SC91	Copolímero de Acrilatos de Sodio (y) Aceite Mineral (y) PPG-1 Trideceth-6	BASF	1,00	1,00	1,00	1,00
Parte E						
Dow Corning 345 Fluido	Ciclometicona	Dow Corning	3,00	3,00	3,00	3,00
Conservante			cs	cs	cs	cs

Instrucciones de Fabricación: Calentar la parte A y la parte B (sin Amphisol K) hasta 80 °C, a continuación añadir Amphisol K en la parte B y agitar lentamente durante unos pocos minutos. Añadir la parte A en la parte B y mezclar bien. Añadir la parte C. Enfriar con agitación continua y añadir la parte D a aproximadamente 60 °C. A continuación añadir la parte F por debajo de 40 °C. Como alternativa, BAFSI se puede añadir al sistema posteriormente después

de que se haya formado una emulsión. *Agentes Activos de Protección Solar Opcionales. **La adición de BAFSI mejora el antienviejimiento y otras propiedades funcionales de la formulación.

Ejemplo 11

Gel protector solar

5 Composición

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporciona)			
Parte A						
Finsolv EB	Benzoato de Etilhexilo	Finetex	5,00	5,00	5,00	5,00
DUB VCI10	Neopentanoato de Isodecilo Stearinerie	Dubois	5,00	3,00	3,00	3,00
Neo Heliopan 303	Neopentanoato de Isodecilo	Symrise	2,50	2,50	2,50	2,50
Neo Heliopan, Tipo OS	Salicilato de Etilhexilo	Symrise	5,00	5,00	5,00	5,00
Parsol 1789	Butil Metoxidibenzoilmetano	DSM	3,00	3,00	3,00	3,00
TINOSORB® S	Bis-Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina	BASF	2,00	2,00	2,00	2,00
Parte B						
Agua	Agua	cs para un 100 %	cs para un 100 %	cs para un 100 %	cs para un 100 %	cs para un 100 %
Glicerina al 85 %	Glicerina	Fluka	3,00	3,00	3,00	3,00
	BAFSI Ejemplo 2 o 7**	IBT, LLC	0,10	1,00	2,00	4,00
Keltrol RD	Goma de Xantano	Rahn	0,20	0,20	0,20	0,20
Dissolvine NA-2-P	EDTA Disódico	Akzo Nobel	0,20	0,20	0,20	0,20
TINOVIS®GT C	Copolímero de Acrilatos/Beheneth-25 Metilacrilato	BASF	2,50	2,50	2,50	2,50
Parte C						
Hidróxido Sódico (solución al 30 %)	Agua (e) Hidróxido Sódico	Fluka	cs	cs	cs	cs
Parte D						
DOW CORNING® 1503 FLUIDO	Dimeticona (y) Dimeticonol	Dow Corning	2,00	2,00	2,00	2,00

(continuación)

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporciona)			
Parte D						
Orgasol 2002 D NAT COS 20 Micrómetros	Nailon-12	Atofina	2,00	2,00	2,00	2,00
	Conservante		cs	cs	cs	cs

5 **Instrucciones de Fabricación:** Mezclar los ingredientes de la parte B, dispersar la Goma de Xantano, Calentar la parte A y mezclar hasta homogeneidad. Enfriar a temperatura ambiente. Incorporar la parte A en la parte B con agitación suficiente. Neutralizar con la parte C a pH 6-6,5. Por último, añadir los ingredientes de la parte D en el orden enumerado. Como alternativa, BAFSI se puede añadir al sistema posteriormente después de que se haya formado un gel. **La adición de BAFSI mejora el antienvjecimiento y otras propiedades funcionales de la formulación.

Ejemplo 1210 **Loción Hidratante****Composición**

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporciona)			
Parte A						
Ácido Esteárico	Ácido Esteárico	J.T. Baker	3,00	3,00	3,00	3,00
Tegin M	Estearato de Glicerilo	Evonik	1,00	1,00	1,00	1,00
Estol 3609	Trietilhexanoína	Croda	7,00	7,00	7,00	7,00
Elefac I-205	Neopentanoato de Octildodecilo	Bernel (Rovi)	7,00	7,00	7,00	7,00
Stantiv OMA-2	Copolímero de Octadeceno/MA (y) diversos ésteres	Caschem	1,00	1,00	1,00	1,00
Finsolv EB	Benzoato de Etilhexilo	Finetex	5,00	5,00	5,00	5,00
Parte B						
Agua	Agua		cs para un 100 %			
Glicerina	Glicerina al 85 %	Fluka	5,00	5,00	5,00	5,00
Dissolvine NA-2-P	EDTA Disódico	Akzo Nobel	0,20	0,20	0,20	0,20

(continuación)

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporciona)			
Parte B						
	BAFSI Ejemplo 2 o 7**	IBT, LLC	0,10	1,00	2,00	4,00
Parte C						
TEA al 99 % T	Trietanolamina	Dow Chemical	cs,	cs,	cs,	cs,
Parte D						
Dow Corning 200/350 cs Fluido	Dimeticona	Dow Corning	1,00	1,00	1,00	1,00
Parte E						
Mackaderm Asto-Dry	Octenilsuccinato de Aluminio y Almidón	Mc Intyre	5,00	5,00	5,00	5,00
TINOVIS® ADE	Copolímero de Acrilatos de Sodio (y) Polideceno Hidrogenado (y) PPG-1 Trideceth-6	BASF	0,10	0,10	0,10	0,10

Instrucciones de Fabricación: Calentar la parte A y la parte B a 80 °C. Ajustar el pH de B a aproximadamente 6, y a continuación añadir A en B con agitación velocidad. Enfriar con agitación, ajustar el pH a 7. Añadir la parte D con agitación. Homogeneizar de nuevo a aproximadamente 50 °C. Por debajo de 40 °C añadir los ingredientes de la parte E en el orden enumerado. Ajustar el pH final a aproximadamente 7,0. Como alternativa, BAFSI se puede añadir al sistema posteriormente después de que se haya formado. **La adición de BAFSI mejora el antienvjecimiento y otras propiedades funcionales de la formulación.

Ejemplo 13

10 Loción de protección solar

Composición

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporciona)			
Parte A						
Sensanov WR	Fosfato de alquilo C20-22 (y) Alcoholes C20-C22	Seppic	4,00	4,00	4,00	4,00
Cetiol B	Adipato de Dibutilo	Cognis	4,00	4,00	4,00	4,00

(continuación)

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporciona)			
Parte A						
Uvinul A Plus	Benzoato de Dietilamino Hidroxibenzoil Hexilo	BASF	10,00	10,00	10,00	10,00
Parsol MCX	Metoxicinnamato de Etilhexilo	DSM	7,50	7,50	7,50	7,50
TINOSORB® S	Bis-Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina	BASF	2,00	2,00	2,00	2,00
Uvinul T 150	Etilhexil Triazona	BASF	1,00	1,00	1,00	1,00
Parte B						
Agua	Agua		c.s.p 100 %	c.s.p 100 %	c.s.p 100 %	c.s.p 100 %
Dissolvine NA-2-P	EDTA Disódico	Akzo Nobel	0,20	0,20	0,20	0,20
	BAFSI Ejemplo 2 o 7**	IBT, LLC	0,10	1,00	2,00	4,00
Tris Amino Ultra Puro	Trometamina	Angus Chemie GmbH	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.
Parte C						
Dow Corning 246 Fluido	Ciclohexasiloxano (y) Ciclopentasiloxano	Dow Corning	5,00	5,00	5,00	5,00
Parte D						
TINOVIS® ADE	Copolímero de Acrilatos de Sodio (y) Polideceno Hidrogenado (y) PPG-1 Trideceth-6	BASF	0,40	0,40	0,40	0,40
Parte E						
Conservante			c.s.	c.s.	c.s.	c.s.

Instrucciones de Fabricación: Calentar la parte A y la parte B a 75 °C con mezcla hasta que ambas sean homogéneas. Añadir la parte A (75 °C) en la parte B (75 °C) y homogeneizar. A 60 °C, añadir la parte C y mezclar hasta homogeneidad. Añadir la parte D y homogeneizar. Enfriar a temperatura ambiente, añadir la parte E y mezclar hasta homogeneidad. Ajustar el pH a aproximadamente 6,0. Como alternativa, BAFSI se puede añadir al sistema posteriormente después de que se haya formado. **La adición de BAFSI mejora el antienviejecimiento y otras

propiedades funcionales de la formulación.

Ejemplo 14

Loción de Gel Facial

Composición

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporciona)			
Parte A						
Tegosoft P	Palmitato de Isopropilo	Evonik	5,00	5,00	5,00	5,00
Elefac I-205	Neopentanoato de Octildodecilo	Bernel (Rovi)	7,00	7,00	7,00	7,00
Parte B						
Agua	Agua		cs para 100	cs para 100	cs para 100	cs para 100
Glicerina al 85 %	Glicerina	Fluka	5,00	5,00	5,00	5,00
Keltrol T	Goma de Xantano	Rahn	0,20	0,20	0,20	0,20
Dissolvine NA-2	EDTA Disódico	Akzo Nobel	0,10	0,10	0,10	0,10
Parte C						
TINOVIS® ADE	Copolímero de Acrilato de Sodio (y) Polideceno Hidrogenado (y) PPG-1 Trideceth-6	BASF	1,50	1,50	1,50	1,50
Parte D						
BAFSI Ejemplo 2 o 7**		IBT, LLC	0,10	0,5	1,00	2,00
Dry- Flo PC	Octenilsuccinato de Aluminio y Almidón	Akzo Nobel	1,00	1,00	1,00	1,00
Conservantes			cs.	cs.	cs.	cs.

5

Instrucciones de Fabricación: Añadir la parte A parte B con agitación. Homogeneizar durante un breve periodo de tiempo. Añadir la parte C con agitación. Cuando sea homogénea, añadir los ingredientes de la parte D en el orden enumerado. Como alternativa, BAFSI se puede añadir al sistema posteriormente después de que se haya formado. **La adición de BAFSI mejora el antienviejimiento y otras propiedades funcionales de la formulación.

10 Ejemplo 15

Loción de Tonificación Facial

Composición

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporcióna)			
Parte A						
Agua	Agua		cs para un 100	cs para un 100	cs para un 100	cs para un 100
Carbopol 940 (solución al 2 %)	Carbómero	Lubrizol	20,00	20,00	20,00	20,00
Dissolvine 220S	EDTA Disódico	Akzo Nobel	0,05	0,05	0,05	0,05
Polímero Flexan II	Sulfonato de Poliestireno Sódico	Akzo Nobel Surface Chemistry	1,00	1,00	1,00	1,00
Glicerina al 85 %	Glicerina	Fluka	3,00	3,00	3,00	3,00
Parte B						
Lanette O	Alcohol Cetearílico	BASF	2,00	2,00	2,00	2,00
Emerest 2400	Monosarato de Glicerilo	BASF	1,00	1,00	1,00	1,00
DC 245	Ciclometicona	Dow Corning	1,50	1,50	1,50	1,50
Crodamol GTCC	Triglicéridos Caprílico/Cáprico	Croda	2,50	2,50	2,50	2,50
Brij 721	Steareth-21	Croda	0,80	0,80	0,80	0,80
Brij 72	Steareth-2	Croda	0,50	0,50	0,50	0,50
Parte C						
	BAFSI Ejemplo 2 o 7**	IBT, LLC	0,10	0,50	1,00	3,00
Parte D						
Trietanolamina al 99 %	Trietanolamina		cs.	cs.	cs	cs.
Conservantes			cs.	cs.	cs	cs.

5 **Instrucciones de Fabricación:** Por separado, combinar la Fase A y la Fase B, y calentar ambas a 80 °C. Añadir la Fase A a la Fase B con alto cizallamiento durante 5 min. Mezclar durante 15-30 min con agitación de moderada a baja. Enfriar a 40 °C, añadir la Fase C. Si fuera necesario, ajustar el pH a 5,8-6,3 y añadir conservantes (Fase D). Como alternativa, BAFSI se puede añadir al sistema posteriormente después de que se haya formado. **La adición de BAFSI mejora el antienviejimiento y otras propiedades funcionales de la formulación.

Ejemplo 16

Serum Antienviejimiento

10 Composición

Nombre Comercial	Nombre INCI / Nombre Químico	Proveedor	% en p/p (tal como se proporciona)			
Parte A						
Agua	Agua		cs para un 100	cs para un 100	cs para un 100	cs para un 100
Dissolvine 220-S	EDTA Tetrasódico	Akzo Nobel	0,10	0,10	0,10	0,10
Hydrolite 5	Pentilenglicol	Symrize	1,50	1,50	1,50	1,50
Glicerina 85 %	Glicerina	Fluka	3,00	3,00	3,00	3,00
	BAFSI Ejemplo 2 o 7**	IBT, LLC	0,01	10,00	50,00	95,00
Parte B						
Reguladores del pH			cs.	cs.	cs	cs.
Conservantes			cs.	cs.	cs	cs.

Instrucciones de Fabricación: Combinar la Fase A de una en una con una agitación suficiente. Mezclar durante 15-30 min con agitación de moderada a baja. Si fuera necesario, ajustar el pH al nivel objetivo que depende de la zona objetivo, cara (pH 4,0-6,9) o zona alrededor del ojo (6,7 - 7,3) y añadir los conservantes de la Fase B. **La adición de BAFSI proporciona propiedades antienvjecimiento y otras propiedades funcionales de la formulación.

5

Los **Ejemplos 10-16** mencionados anteriormente no son ejemplos limitantes de las formulaciones acabadas de la presente invención. Los ejemplos se proporcionan únicamente con el fin de ilustración y no se deben interpretar como limitaciones de la presente invención, ya que son posibles muchas variaciones de las mismas sin apartarse del alcance de la invención, que podría ser reconocido por alguien con una experiencia habitual en la materia. En los ejemplos, todas las concentraciones se enumeran como porcentaje de peso, a menos que se indique de otro modo y pueden excluir materiales secundarios tales como diluyentes, carga, etcétera. Por lo tanto, las formulaciones enumeradas comprenden los componentes enumerados y cualquier material secundario asociado con tales componentes. Tal como es evidente para alguien con una experiencia habitual en la materia, la selección de estos materiales secundarios variará dependiendo de las características físicas y químicas de los ingredientes seleccionados en particular para preparar la presente invención como se describe en el presente documento.

10

15

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas de la misma, los expertos en la materia deberían entender que se pueden realizar diversos cambios y que los equivalentes se pueden sustituir sin apartarse del verdadero alcance de la invención. Además, se pueden realizar muchas modificaciones para adoptar una situación, material, composición de materia, procedimiento, etapa o etapas del procedimiento en particular para el alcance objeto de la presente invención. Se pretende que todas estas modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a las mismas.

20

En el presente documento, la mención de una referencia no se deberá interpretar como una admisión de que tal referencia es técnica anterior a la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar una fracción bioactiva alterada a partir de un organismo fotosintético acuático inducido por estrés, comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 proporcionar un organismo fotosintético acuático;
 cultivar el organismo fotosintético acuático en condiciones de cultivo inducido por estrés que comprende someter al organismo fotosintético a un factor de estrés o a una pluralidad de factores de estrés para producir un organismo fotosintético inducido por estrés que tiene una fracción bioactiva alterada y adecuado para su uso en el aislamiento de la fracción bioactiva alterada a partir del mismo;
 10 en el que el factor de estrés o pluralidad de factores de estrés se selecciona entre el grupo que consiste en: estrés por luz ultravioleta mediante aplicación de radiación UVB de 1 o 2 mW/cm² de 3 a 12 horas al día; estrés por ozono mediante inyección de ozono para obtener un potencial redox de 200 a 400 y una concentración de O₂ disuelto de 7,0 a 9,0 mg/l; estrés osmótico mediante aplicación de una osmolalidad de medio de cultivo de 600 a 1200 mOs/kg; reducir la presión hidrostática en comparación con la de las condiciones originales; y una combinación de los mismos, y
 15 en el que el factor de estrés o pluralidad de factores de estrés alteran al menos una característica de al menos una fracción bioactiva aislada del organismo fotosintético inducido por estrés en comparación con una fracción bioactiva correspondiente aislada de un organismo fotosintético no inducido por estrés;
 separar el organismo fotosintético inducido por estrés en jugo celular y un componente de las paredes celulares; tratar el jugo celular en condiciones eficaces para producir una fracción bioactiva, en el que dicha fracción bioactiva se selecciona entre el grupo que consiste en una fracción de suero celular, una fracción de membrana, una fracción de sobrenadante de jugo celular, y una fracción de filtrado de suero celular; y
 20 aislar dicha fracción bioactiva del jugo celular tratado,
 en el que la fracción bioactiva aislada tiene al menos una característica alterada en comparación con una fracción bioactiva correspondiente aislada de un organismo fotosintético no inducido por estrés, en el que dicho organismo fotosintético acuático es un organismo fotosintético acuático de una clase seleccionada entre el grupo que consiste en Phaeophyceae y Chlorophyceae, o una *Macrocystis* spp., seleccionada entre el grupo que consiste en *Macrocystis angustifolia*, *Macrocystis integrifolia*, *Macrocystis laevis*, y *Macrocystis pirifera*, o una *Chaetomorpha* spp. seleccionada entre el grupo que consiste en *Chaetomorpha aerea*, *Chaetomorpha antennina*, *Chaetomorpha basiretorsa*, *Chaetomorpha brachygona*, *Chaetomorpha californica*, *Chaetomorpha cannabina*, *Chaetomorpha crassa*, *Chaetomorpha gracilis*, *Chaetomorpha linum*, *Chaetomorpha melagonium*, *Chaetomorpha natalensis*, y *Chaetomorpha spiralis*.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha al menos una característica se selecciona entre el grupo que consiste en propiedades fisicoquímicas, propiedades de modificación de superficie, propiedades hidratantes, actividad antiinflamatoria, y actividad de antienvjecimiento,
 35 en el que las propiedades fisicoquímicas se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en tensión superficial, contenido de materia seca, y osmolalidad, y
 en el que las actividades antiinflamatorias y/o antienvjecimiento se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en inhibición de elastasa, inhibición de tripsina, actividad antioxidante, y actividad de neutralización de radicales libres.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho organismo fotosintético acuático es un organismo fotosintético acuático seleccionado entre el grupo que consiste en *Macrocystis angustifolia*, *Macrocystis integrifolia*, *Macrocystis laevis*, y *Macrocystis pirifera*, o una *Chaetomorpha* spp. seleccionada entre el grupo que consiste en *Chaetomorpha aerea*, *Chaetomorpha antennina*, *Chaetomorpha basiretorsa*, *Chaetomorpha brachygona*, *Chaetomorpha californica*, *Chaetomorpha cannabina*, *Chaetomorpha crassa*, *Chaetomorpha gracilis*, *Chaetomorpha linum*, *Chaetomorpha melagonium*, *Chaetomorpha natalensis*, y *Chaetomorpha spiralis*.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que cuando el organismo fotosintético acuático es un alga marina marrón gigante (*Macrocystis pirifera*), entonces el estrés por UVB consiste en aplicar una radiación UVB de 2 mW/cm², el estrés por ozono consiste en inyectar ozono continuamente a 100 mg/hora y los tiempos de cultivos son 72 horas (3 días) o 96 horas (4 días).

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que cuando el organismo fotosintético acuático es un alga verde (*Chaetomorpha linum*), entonces el estrés por UVB consiste en aplicar una radiación UVB de 2 mW/cm², el estrés por ozono consiste en inyectar ozono continuamente a 100 mg/hora y los tiempos de cultivos son 24 horas (1 día), 72 horas (3 días), 96 horas (4 días), 288 horas (12 días) o 456 horas (19 días).

6. Una fracción bioactiva alterada aislada de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha al menos una característica alterada se selecciona entre el grupo que consiste en propiedades fisicoquímicas, propiedades de modificación de superficie, propiedades hidratantes, actividad antiinflamatoria, y actividad de antienvjecimiento, en el que la propiedad fisicoquímica se selecciona entre el grupo que consiste en tensión superficial, contenido de materia seca, y osmolalidad.

7. Una fracción bioactiva alterada de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la propiedad fisicoquímica se selecciona entre contenido de materia seca, y osmolalidad.
8. Una fracción bioactiva alterada de acuerdo con la reivindicación 6, en la que las actividades antiinflamatorias y/o antienviejimiento se seleccionan entre el grupo que consiste en inhibición de elastasa, inhibición de tripsina, actividad antioxidante, y actividad de neutralización de radicales libres.
9. Una fracción bioactiva alterada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en las que la fracción se ha aislado a partir de material vegetal recién obtenido sin ningún disolvente o agente químico externo y sin dañar la homeostasis de la presión osmótica intracelular.
10. Una fracción bioactiva alterada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en las que dicha fracción bioactiva está sustancialmente libre de componentes no deseados, tales como proteínas.
11. Una composición bioactiva que comprende una fracción bioactiva alterada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.
12. La composición bioactiva de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende adicionalmente un agente estabilizante, tal como un emulgente, un conservante, un antioxidante, una matriz polimérica, y mezclas de los mismos.
13. La composición bioactiva de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12 para su uso para inhibir actividad inflamatoria en el tejido cutáneo de un mamífero, proteger el tejido cutáneo de un mamífero del daño inducido por luz ultravioleta, o para su uso para normalizar trastornos cutáneos en el tejido cutáneo de un mamífero, mediante aplicación de la the composición bioactiva al tejido cutáneo.
14. Una formulación bioactiva tópica adecuada para aplicación tópica a un mamífero, comprendiendo dicha formulación tópica bioactiva:
- una cantidad tópicamente eficaz de la composición bioactiva de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, y un vehículo tópicamente aceptable, en la que el vehículo tópicamente aceptable puede ser una base de crema hidrófila, una base de loción hidrófila, una base de tensioactivo hidrófila, una base de gel hidrófila, una base de solución hidrófila, una base de crema hidrófoba, una base de loción hidrófoba, una base de tensioactivo hidrófoba, una base de gel hidrófoba, o una base de solución hidrófoba.
15. La formulación tópica bioactiva de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la composición bioactiva está presente en una cantidad que varía entre aproximadamente un 0,01 por ciento y aproximadamente un 98,0 por ciento del peso total de la formulación tópica bioactiva.
16. La formulación tópica bioactiva de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en la que la formulación tópica bioactiva es para su uso en aplicaciones para el cuidado de la piel, aplicaciones para cuidado de la piel, aplicaciones para cuidado del cabello, y aplicaciones para cuidado personal, o en la que la formulación tópica bioactiva es para su uso como una loción seleccionada entre el grupo que consiste en una loción cutánea, un emulgente sin gel de protección solar, una loción hidratante, una loción de protección solar, una loción de gel facial , una loción de tonificación facial , y una loción antienviejimiento.
17. Un sistema para cultivar organismos fotosintéticos inducidos por estrés, comprendiendo dicho sistema:
- un biorreactor para cultivar un organismo fotosintético; y un sistema de control de cultivo para controlar las condiciones de cultivo en el biorreactor,
- en el que dicho sistema de control de cultivo está configurado para introducir una combinación de dos o más factores de estrés en el biorreactor, y está configurado para modular la intensidad, duración, y/o concentración de la combinación de dos o más factores de estrés en el biorreactor, y en el que la combinación de dos o más factores de estrés se selecciona entre el grupo que consiste en luz ultravioleta, ozono, presión osmótica, presión hidrostática, y una combinación de los mismos,
- en el que dicho organismo fotosintético es un organismo fotosintético acuático de una clase seleccionada entre el grupo que consiste en Phaeophyceae y Chlorophyceae, o una *Macrocystis* spp., seleccionada entre el grupo que consiste en *Macrocystis angustifolia*, *Macrocystis integrifolia*, *Macrocystis laevis*, y *Macrocystis pirifera*, o una *Chaetomorpha* spp. seleccionada entre el grupo que consiste en *Chaetomorpha aerea*, *Chaetomorpha antennina*, *Chaetomorpha basiretorsa*, *Chaetomorpha brachygona*, *Chaetomorpha californica*, *Chaetomorpha cannabina*, *Chaetomorpha crassa*, *Chaetomorpha gracilis*, *Chaetomorpha linum*, *Chaetomorpha melagonium*, *Chaetomorpha natalensis*, y *Chaetomorpha spiralis*., y, opcionalmente, en el que dicho biorreactor está configurado para cultivar el organismo fotosintético acuático en un medio líquido.

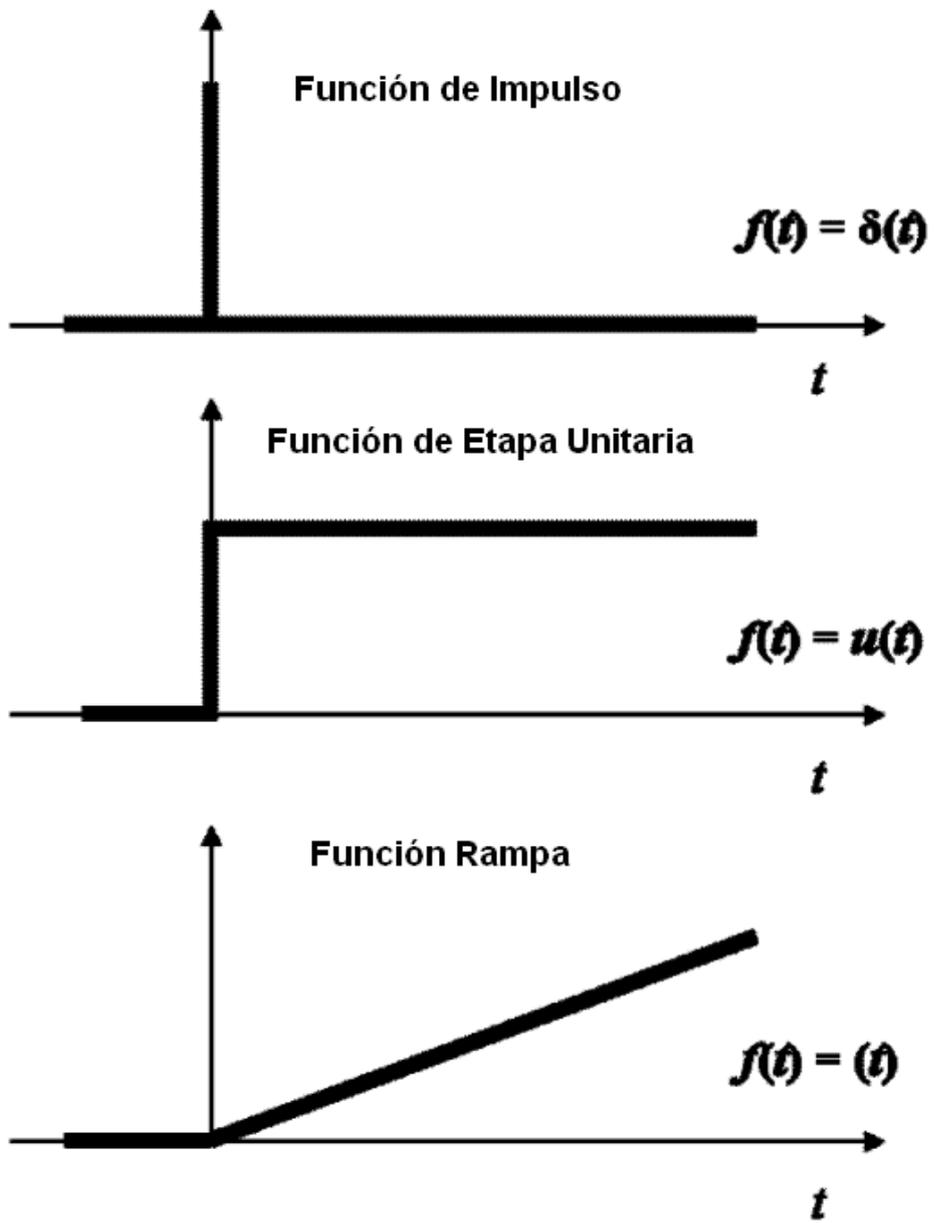


FIG. 1

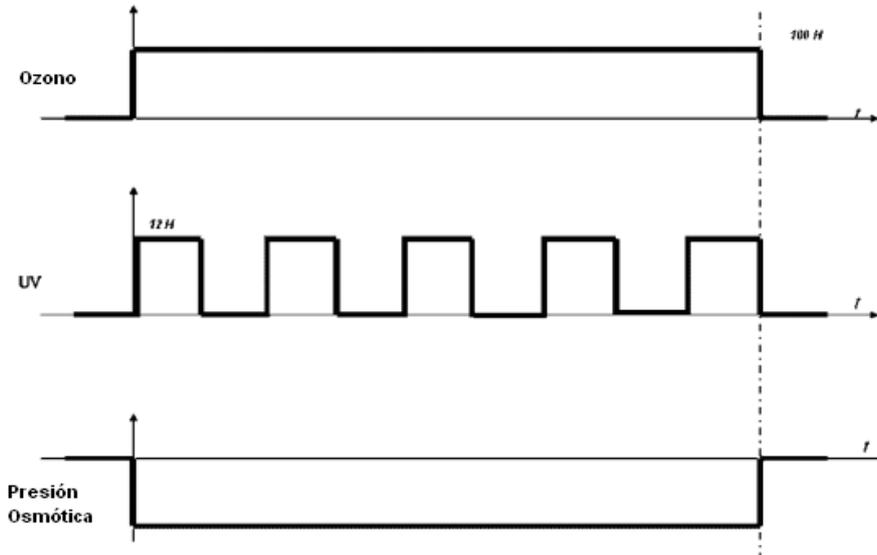


FIG. 2

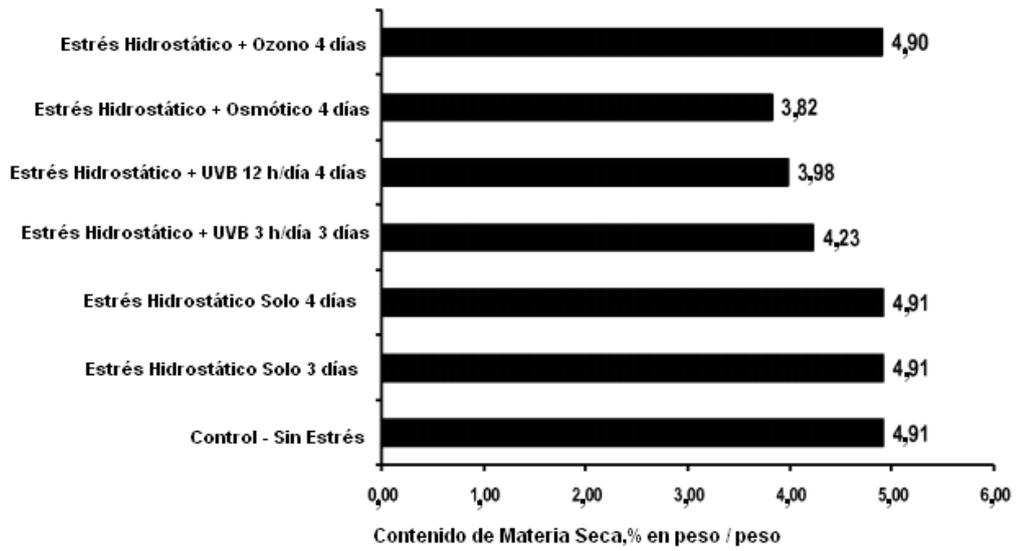


FIG. 3

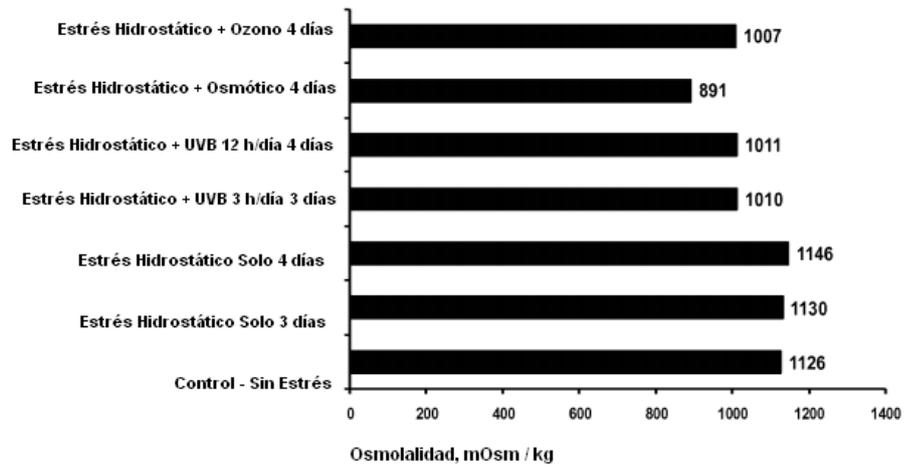


FIG. 4

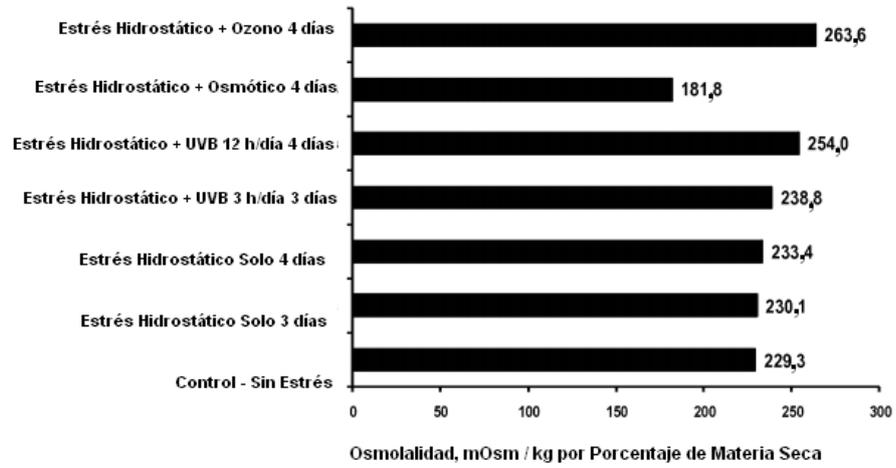


FIG. 5

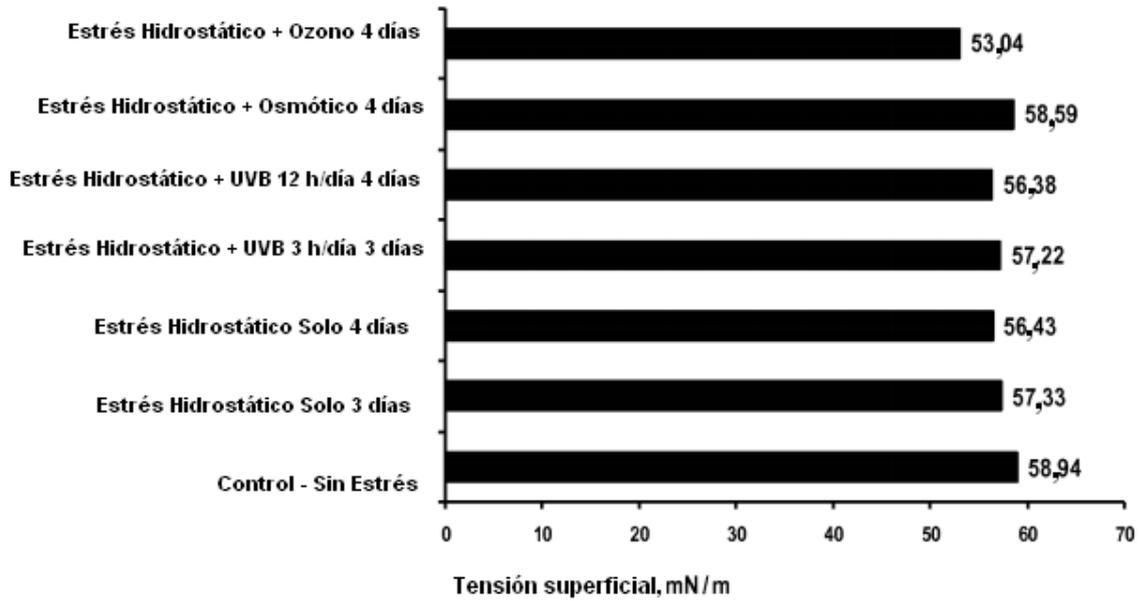


FIG. 6

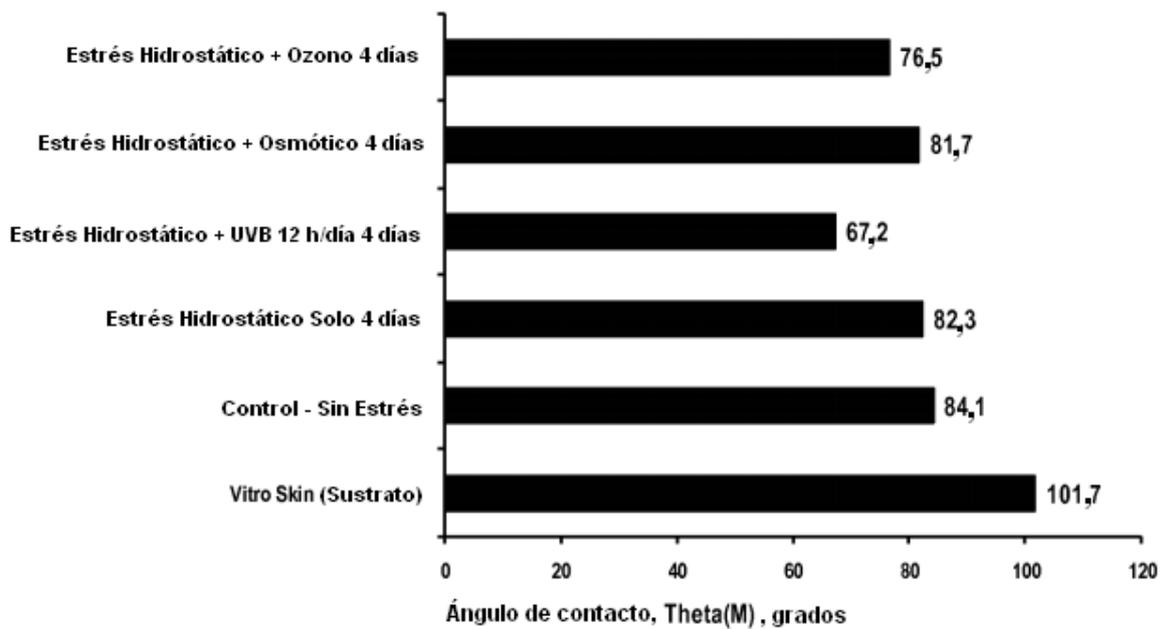


FIG. 7

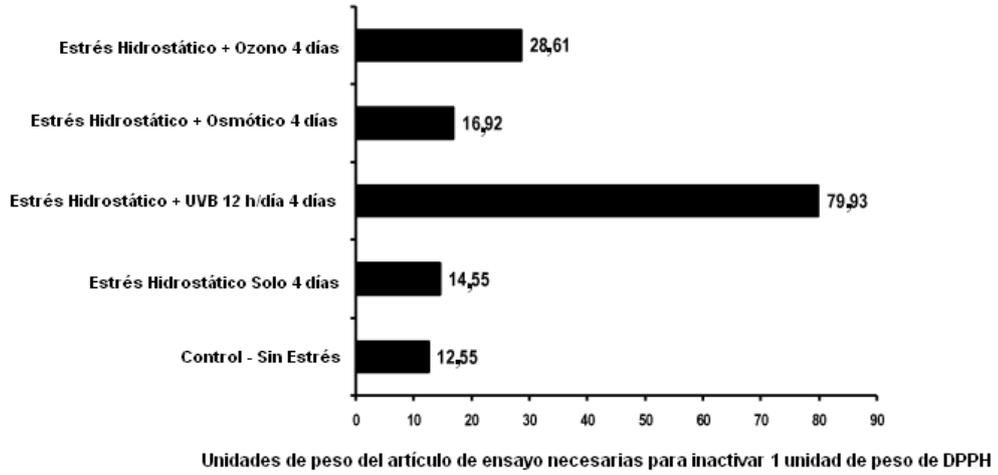


FIG. 8

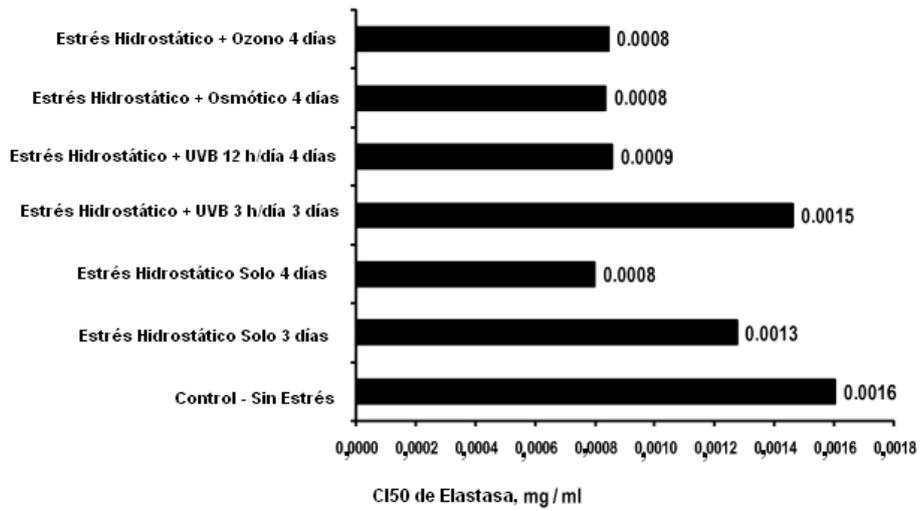


FIG. 9

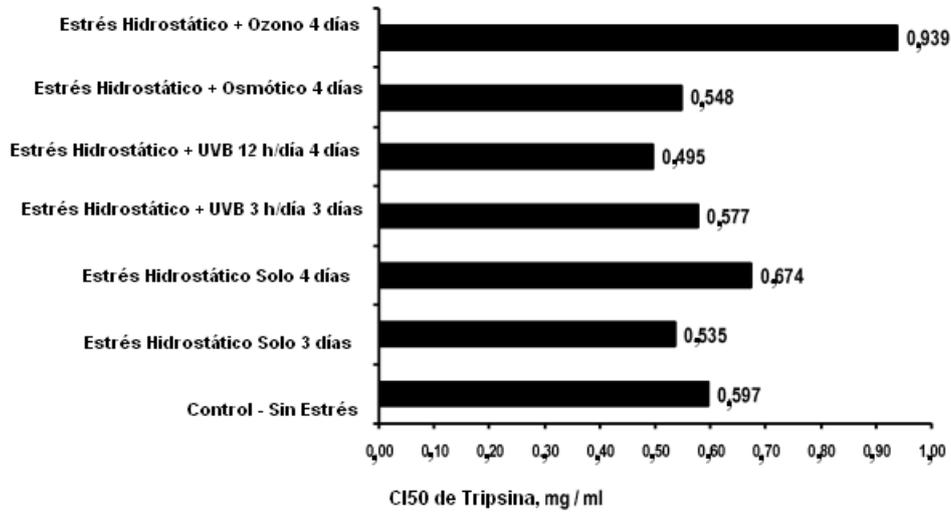


FIG. 10

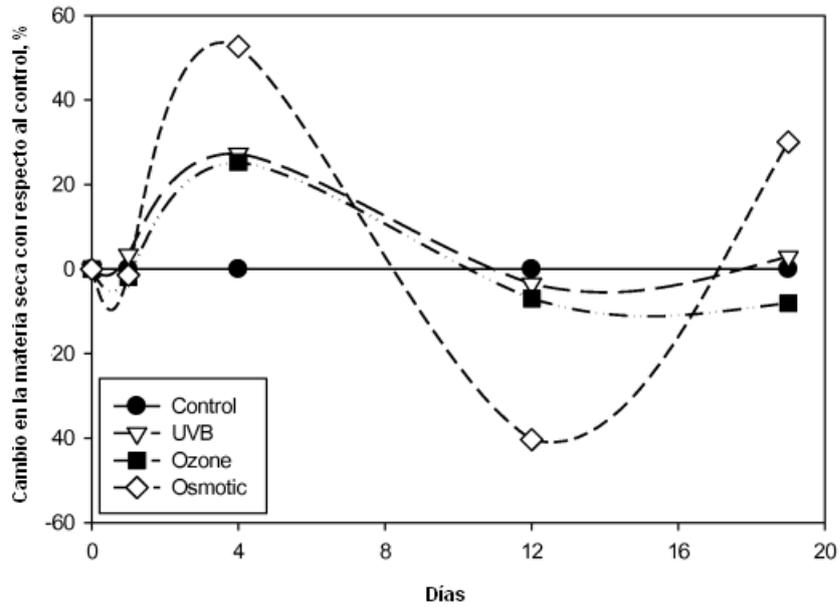


FIG. 11

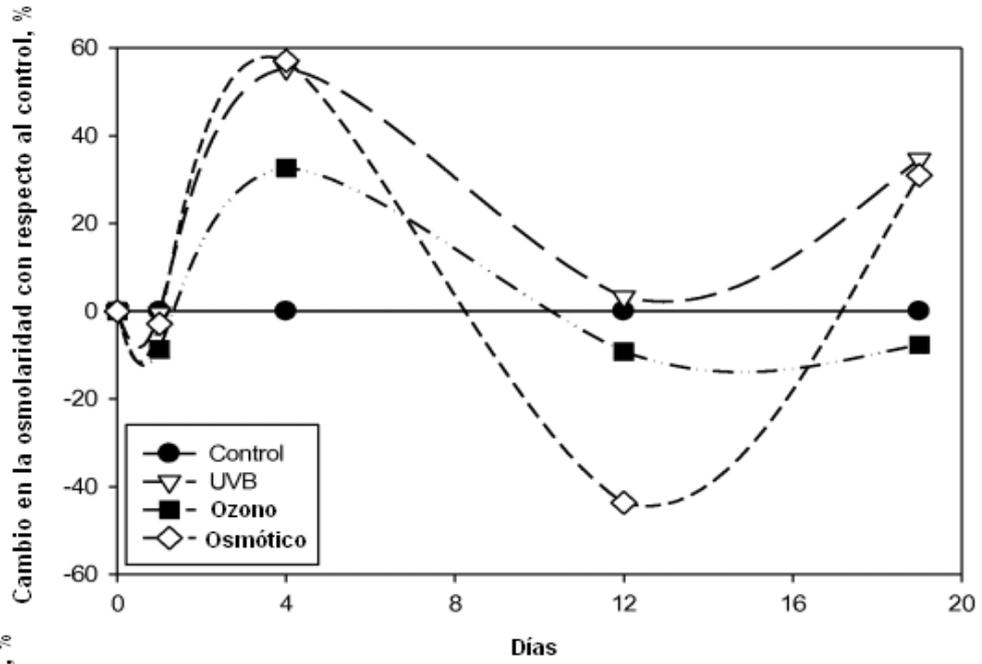


FIG. 12

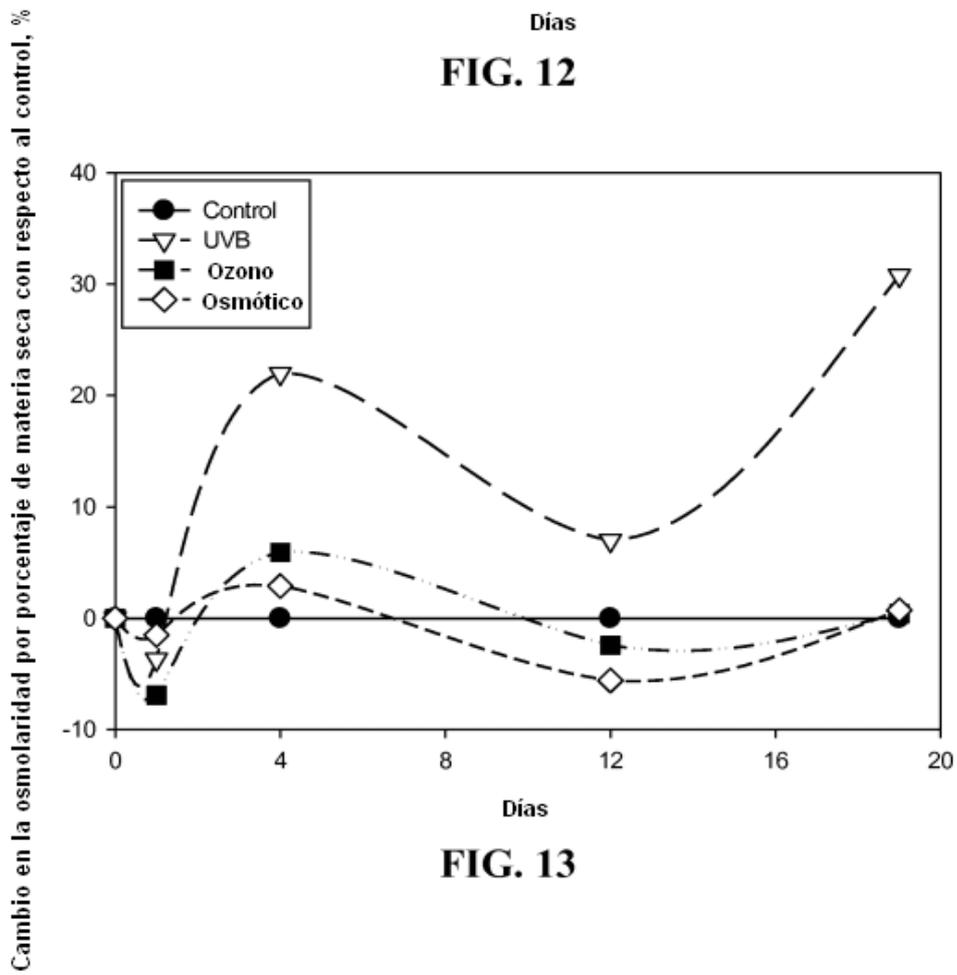


FIG. 13

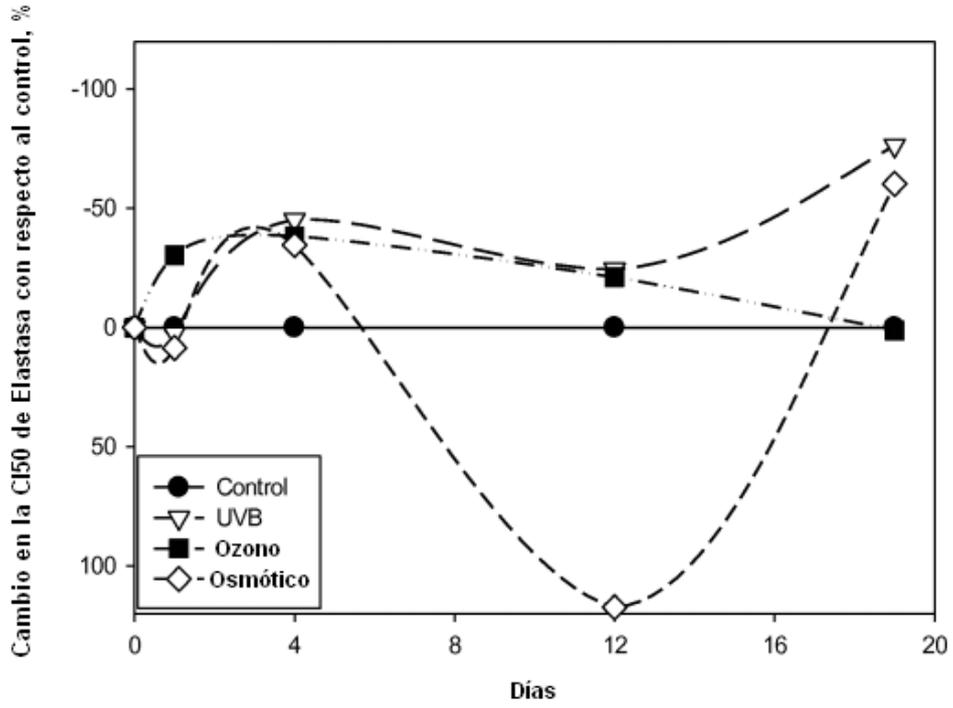


FIG. 14

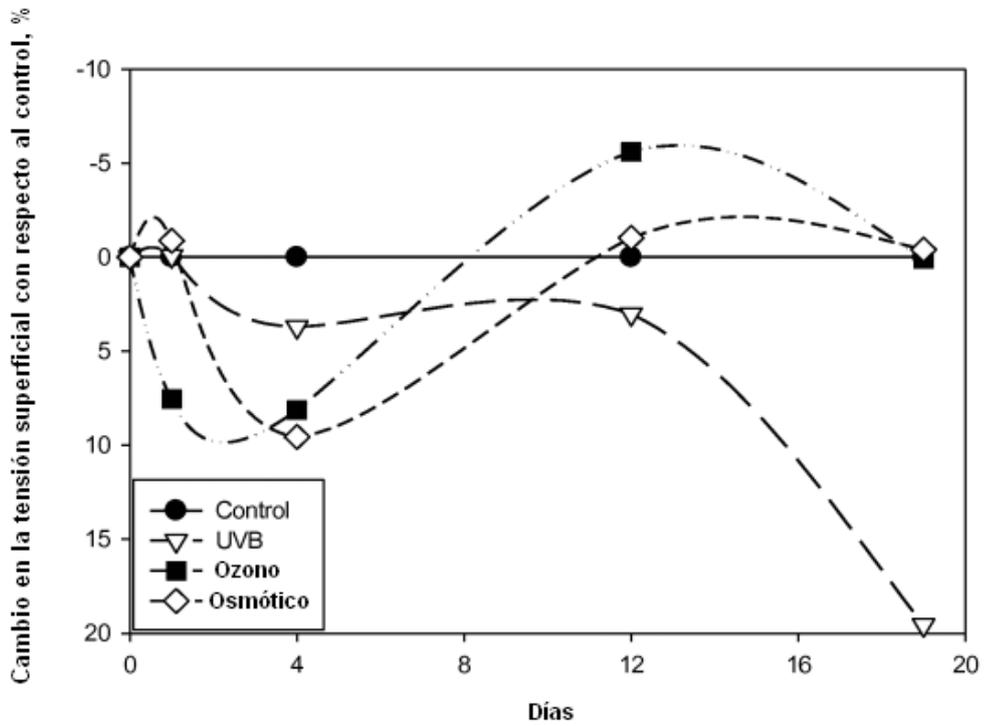


FIG. 15

Cambio en la capacidad de absorción de radicales de oxígeno con respecto al control, %

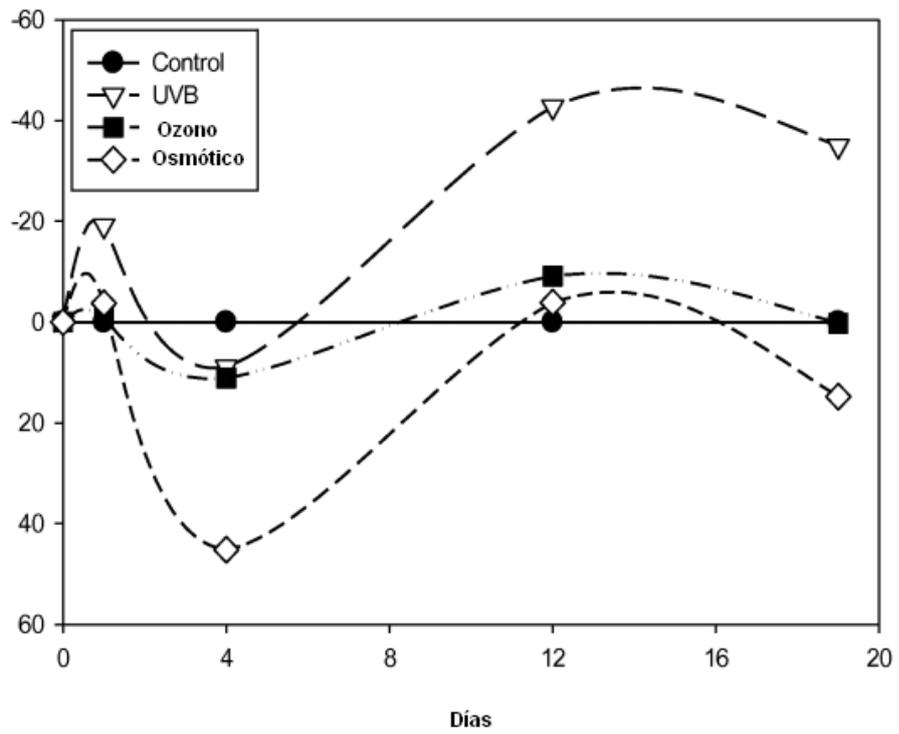


FIG. 16



FIG. 17