

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 405**

51 Int. Cl.:

G01N 33/15 (2006.01)

A61K 8/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/JP2012/083144**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO2013099775**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12863763 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2799865**

54 Título: **Método para evaluar cosméticos**

30 Prioridad:

26.12.2011 JP 2011283045

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2017

73 Titular/es:

**SHISEIDO COMPANY, LTD. (100.0%)
5-5 Ginza 7-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-0061, JP**

72 Inventor/es:

**IWAI, ICHIRO y
YAGI, EIICHIRO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 613 405 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

Método para evaluar cosméticos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para evaluar cosméticos. Preferiblemente, la invención se refiere a un método para evaluar el efecto de mejora en la piel, y más preferiblemente, el efecto de mejora en la capa córnea, de los cosméticos.

Estado de la Técnica

10 La rugosidad de la piel se produce frecuentemente en la temporada de invierno de baja humedad y rara vez en la temporada de verano de alta humedad, y la experiencia demuestra que la retención de la humedad es necesaria para mantener la piel sana. Por otra parte, se considera que una piel bella es la piel que es transparente y que tiene una textura de piel equilibrada, y se están llevando a cabo investigaciones sobre métodos de evaluación de la transparencia del estrato córneo y métodos de evaluación de los medicamentos que aumentan la transparencia del estrato córneo (PTL 1 y 2), y se está demostrando que la transparencia del estrato córneo esta asociada con la estructura de los lípidos intercelulares en el estrato córneo (PTL 3). Aunque se sabe que la retención de la humedad es necesaria para mantener la piel sana, húmeda, y que la transparencia es necesaria para una piel hermosa, la relación entre el contenido de humedad del estrato córneo y la transparencia o la salud de la piel no han sido suficientemente estudiadas, y el estado actual del conocimiento es insuficiente.

15 Por otra parte, a fin de discernir la madurez de las células del estrato córneo y el estado de la piel, también se han descubierto métodos para medir del área y el espesor de las células del estrato córneo, y de este modo calcular el índice platimérico (PTL 4). Sin embargo, esta publicación describe únicamente la medición del área y espesor de las células del estrato córneo en un estado normal (estado no hidratado), mientras que no implica mediciones de la superficie de las células hinchadas con aguas cosméticas o similares.

20 Además se conoce un método para determinar la eficacia de una composición para el cuidado de la piel, el método comprende calcular la eficacia de una composición para el cuidado de la piel en función de (a) el perfil de concentración de una sustancia activa en Raman asociado a la eficacia de la composición para el cuidado de la piel en un test de la zona de la piel antes y después de la aplicación de la composición para el cuidado de la piel utilizando la espectroscopia confocal Raman, y (b) el espesor del estrato córneo en el test de la zona de la piel antes y después de aplicar la composición para el cuidado de la piel (PTL 5).

Lista de documentos citados

30 Literatura Patente

[PTL 1] Publicación de Patente Japonesa no examinada N° 2005-249672

[PTL 2] Publicación de Patente Japonesa no examinada N° 2010-172200

[PTL 3] Publicación de Patente Japonesa no examinada N° 2010-175264

[PTL 4] Publicación de Patente Japonesa no examinada N° 2004-105700

35 [PTL 5] Publicación de Patente Europea N° EP1760440

Literatura no patente

[NPL 1] Journal of the Japan Cosmetic Science Society vol.31, N° 1, pag.19-24 (2007)

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

40 Existe la necesidad de clarificar la relación entre el contenido de humedad en el estrato córneo, y la piel sana y bella, y de un método para evaluar los cosméticos que permitan el desarrollo de productos cosméticos que pueden promover una piel bella sana, basado en este conocimiento. Además, se ha modificado una formulación de acuerdo con las regiones en las que se van a comercializar los cosméticos, y por lo tanto es necesario un método para evaluar los cosméticos que comprenda una formulación adecuada para el hábitat de la región en la que se va a comercializar.

45

Medios para resolver los problemas

Como resultado de una investigación laboriosa sobre la relación entre el contenido de humedad del estrato córneo y la belleza y salud de la piel, los presentes inventores han encontrado que el estrato córneo es opaco cuando se hidrata con agua, y que la transparencia aumenta a medida que se seca (Fig. 1), mientras que el estrato córneo

hidratado con agua exhibe una función de barrera de la piel baja, y la función de barrera de la piel aumenta a medida que se seca (Fig. 2). Dado que la transparencia y la función de barrera del estrato córneo de la piel contribuyen a una piel bella y sana, respectivamente, estos resultados experimentales indicaron que para la piel bella sana, el estado seco es más esencial que el estado húmedo. Puesto que tradicionalmente se ha considerado que la retención de humedad es importante para una piel bella sana y que se debe evitar el estado seco, esta resultó ser una observación sorprendente.

Cuando se llevó a cabo una investigación para estudiar las causas del aumento de la transparencia y de la función de barrera de la piel a medida que el contenido de humedad del estrato córneo disminuye, se encontró que la disminución del contenido de humedad del estrato córneo está asociada con la estructuración ordenada de la estructura de queratina del estrato córneo, así como con la estructuración ordenada de los lípidos intercelulares compuestos de ceramida, colesterol, ácidos grasos y similares, provocando de esta manera la estabilización de la estructura laminar, y proporcionando una función de barrera (Fig. 3).

Los presentes inventores indujeron la hinchazón del estrato córneo con agua, con deterioro de la transparencia y de la función barrera de la piel, en donde el estrato córneo se sometía a una liofilización, lo que dio como resultado la desintegración de la estructura de queratina y de la estructura laminar, y posteriormente se sometió a un proceso de secado normal, y a continuación, se encontró que la transparencia y la función de barrera de la piel eran restauradas por el proceso (Fig. 4 y 5). Se interpretó que la hinchazón del estrato córneo con agua desestabiliza la estructura de la queratina y la estructura laminar, y que la estructura de la queratina y la estructura laminar se reconstituyen de una manera ordenada durante el proceso de secado.

Sobre la base de este conocimiento, los presentes inventores llegaron a la conclusión de que en el proceso de cuidado de la piel para obtener una piel bella saludable, en lugar de simplemente hidratar como se ha hecho en el pasado, es importante llevar primero al estrato córneo a un estado húmedo, suficientemente hinchado como para desestabilizar la estructura de la queratina y la estructura laminar, y luego secarlo para reconstituir la estructura de la queratina y la estructura laminar, y consiguieron inventar un método para evaluar si un cosmético tiene este efecto o no.

Más específicamente, los presentes inventores encontraron que cuando un líquido que tiene el efecto de mejorar la transparencia del estrato córneo, se utiliza en el proceso de hidratación y posterior secado del estrato córneo, el grosor de las células del estrato córneo cambia y la tasa de cambio de espesor del estrato córneo aumenta con pocos cambios en el área de las células del estrato córneo, mientras que si se utiliza un líquido que no mejora la transparencia del estrato córneo, no hay prácticamente ningún cambio en el espesor y en el área de las células del estrato córneo (Figs. 6 y 7). La tasa de cambio de espesor del estrato córneo es un índice representado por la fórmula siguiente:

Tasa de cambio del espesor del estrato córneo (%) =

$$B - A \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C.$$

en donde A es el espesor del estrato córneo antes de la hidratación, B es el espesor del estrato córneo después de la hidratación, y C es el espesor del estrato córneo después del secado. Sobre la base de este conocimiento, los presentes inventores realizaron una invención relacionada con un método de evaluación de la propiedad de mejora de la piel de un cosmético aplicado, utilizando como índice el grosor del estrato córneo seleccionado del grupo que consiste en un estrato córneo aislado y una lámina de estrato córneo cultivado en estado húmedo y, después del secado. Específicamente, la presente invención esta definida en las reivindicaciones y se refiere a:

(1) Un método para evaluar un cosmético, que utiliza como índice la tasa de cambio de espesor del estrato córneo durante el proceso de hidratación del estrato córneo con el cosmético y posterior secado del estrato córneo, el método de evaluación comprende las etapas siguientes:

medir el espesor (A) de las células o de una capa de células del estrato córneo, seleccionada del grupo que consiste en estrato córneo aislado y una capa de estrato córneo cultivada antes de aplicar el cosmético;

medir el espesor (B) de las células o de una capa de células en estado húmedo después de aplicar el cosmético al estrato córneo;

medir el espesor (C) de las células o de una capa de células en estado seco después de secar el estrato córneo;

calcular la tasa de cambio de espesor del estrato córneo durante el proceso de hidratación, y posterior secado del estrato córneo, donde dicho cálculo se lleva a cabo utilizando al fórmula siguiente:

tasa de cambio de espesor del estrato córneo =

$$(B - A) \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C. (1); y$$

determinar que el cosmético tiene un efecto de mejora en la piel si la tasa de espesor del estrato córneo es de 20% a 150%.

(2) El método según (1), donde se estima que el cosmético tiene un efecto de mejora de la piel si la tasa de cambio del estrato córneo es de 25% a 100%.

5 (3) El método según (1) o (2), donde el efecto de mejora en la piel es un efecto de mejora de la transparencia del estrato córneo.

Como resultado de una investigación cuidadosa adicional de la etapa de secado, los presentes inventores encontraron que la transparencia del estrato córneo y la función de barrera de la piel varían dependiendo de los cambios en la humedad durante la etapa de secado (Fig. 8 y Fig. 9). Específicamente, se encontró que cuando el estrato córneo hinchado con agua ha sido secado bajo una humedad alta, tanto la función de barrera de la piel, como la transparencia del estrato córneo son superiores en comparación con él secado bajo una humedad baja. Se cree que esto es debido a la lenta evaporación del agua bajo una humedad alta, que da como resultado la reconstitución ordenada de la estructura de la queratina y de la estructura laminar. En consecuencia, el ajuste de los componentes en el agua cosmética para controlar la tasa de la etapa de secado permite evaluar si el cosmético es adecuado para las condiciones ambientales, tales como el clima en el que se va a utilizar (es decir, la temperatura estándar y humedad estándar de la región en la que se va a comercializar).

A partir de ahí, los presentes inventores desarrollaron un método para evaluar los cosméticos adecuados para un hábitat determinado, que comprende:

20 aplicar los cosméticos al estrato córneo seleccionado del grupo que consiste en un estrato córneo de la piel, un estrato córneo aislado y una lámina de estrato córneo cultivado (que no incluye melanina);

secar los cosméticos a una temperatura prescrita y una humedad prescrita;

medir el contenido de humedad (%) y de transmitancia del estrato córneo (%) durante la etapa de secado, crear un diagrama de cajas y obtener una curva ajustada;

25 determinar si la curva ajustada obtenida en la etapa anterior está dentro de un intervalo entre una curva ajustada (1) obtenida en una etapa de aplicación de agua a la capa córnea y secado en las condiciones de temperatura prescritas y humedad variable de 30% a 90%, y una curva ajustada (2) obtenida en una etapa de secado en las condiciones de temperatura prescritas y 90% de humedad, o no; y

evaluar que el cosmético es adecuado para el hábitat si la curva ajustada está contenida dentro de este intervalo.

30 En una realización preferida de este método de evaluación el límite inferior de humedad bajo la condición para obtener la curva ajustada (1) se selecciona del grupo que consiste en 60%, 70% y 80%.

Además, los presentes inventores desarrollaron un método para evaluar los cosméticos que son adecuados para un hábitat determinado, que comprende:

35 aplicar los cosméticos al estrato córneo seleccionado del grupo que consiste en un estrato córneo de la piel, un estrato córneo aislado y una lámina de estrato córneo cultivado (que no incluye melanina);

secar el cosmético a una temperatura prescrita y a una humedad prescrita;

medir la transmitancia del estrato córneo después del secado; y

evaluar que el cosmético sea adecuado para el hábitat si la transmitancia del estrato córneo es de 85% a 100%.

40 Efecto de la invención

Los presentes inventores han encontrado que los cambios en el espesor del estrato córneo durante el proceso de hidratación y secado están relacionados con la transparencia del estrato córneo tras el proceso de hidratación y secado. Según la invención, por lo tanto, utilizar el grosor del estrato córneo durante el proceso de hidratación y secado como un índice permite determinar si un líquido utilizado es eficaz o no, en términos de su efecto de mejora en la piel, y es útil para el cribado primario durante el desarrollo del producto. Además, se determina la idoneidad de un cosmético para un hábitat determinado, facilitando de este modo el desarrollo del producto.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1 es un gráfico que muestra la relación entre el contenido de humedad del estrato córneo y la transmitancia total del estrato córneo.

Fig. 2 es un gráfico que muestra la relación entre el contenido de humedad del estrato córneo y la transpiración de la humedad, lo que demuestra que la función de barrera de la piel del estrato córneo aumenta a medida que el contenido de humedad del estrato córneo disminuye.

5 Fig. 3 es un gráfico que muestra la relación entre el contenido de humedad del estrato córneo y el grado de orden de los lípidos.

Fig. 4 es un gráfico que muestra la mejora en la transparencia del estrato córneo cuando el estrato córneo que se ha puesto rugoso por la liofilización se vuelve a hidratar con agua.

Fig. 5 es un gráfico que muestra la mejora de la función de barrera de la piel cuando el estrato córneo que se ha puesto rugoso por la liofilización se vuelve a hidratar con agua.

10 Fig. 6 es un gráfico que muestra el cambio en el espesor de una capa de estrato córneo cuando la capa del estrato córneo ha sido hidratada con un líquido. El espesor aumenta cuando se hidrata con una disolución acuosa de glicerina al 10% y una disolución acuosa de parafina líquida + glicerina + espesante, y posteriormente disminuye tras el secado, mientras que no hay cambios en el espesor cuando se hidratan con 100% de etanol.

15 Fig. 7 muestra la transparencia y los efectos de transmitancia del estrato córneo cuando una capa del estrato córneo liofilizado se ha hidratado con líquido y posteriormente secado. La transparencia fue alta y la transmitancia de la capa del estrato córneo fue alta cuando se hidrata con una solución acuosa de glicerina al 10% y una disolución acuosa de parafina líquida + glicerina + espesante, mientras que la transparencia era baja y la transmitancia del estrato córneo también fue baja cuando se hidrata con 100% etanol.

20 Fig. 8 es un gráfico que muestra la relación entre el contenido de humedad y la transmitancia total del estrato córneo tras el secado en condiciones con 30% de humedad, 60% de humedad y 90% de humedad. Fig. 9 es una función de barrera de la piel gráfico que muestra después de secar bajo condiciones de 30% de humedad, 60% de humedad y 90% de humedad.

Fig. 9 es un gráfico que muestra la función de barrera de la piel, después de secar bajo condiciones de 30% de humedad, 60% de humedad y 90% de humedad.

25 **Descripción de la realización de la invención**

La presente invención proporciona un método para evaluar cosméticos utilizando como índice la tasa de cambio en el espesor del estrato córneo durante el proceso de hidratación y secado del estrato córneo. Este método de evaluación permite evaluar los cosméticos para el efecto de mejora de la transparencia del estrato córneo, para el efecto de mejora del estrato córneo, y además para el efecto de mejora de la piel y el efecto de embellecimiento de la piel, y por lo tanto para llevar a cabo la detección de los cosméticos que son útiles para estos efectos.

30 En la presente invención "estado hidratado" es un estado de equilibrio en el que se ha aplicado un cosmético con el fin de hidratar suficientemente el estrato córneo, con la penetración suficiente del cosmético en el estrato córneo. El tiempo para alcanzar un estado húmedo difiere según el tipo de cosmético y por lo tanto el tiempo requerido para alcanzar un estado húmedo no se puede definir para todos los casos, sino que se puede considerar que se ha alcanzado un estado húmedo si el cosmético se mantiene de manera que no se seque durante al menos 1 minuto, preferiblemente al menos 5 minutos, más preferiblemente al menos 10 minutos e incluso más preferiblemente al menos 30 minutos tras la aplicación del cosmético. Puesto que es suficiente alcanzar un estado de equilibrio, por lo general no causa ningún problema si el tiempo de la aplicación de cosméticos es más largo que este tiempo.

40 En la presente invención la tasa de cambio de espesor del estrato córneo es la tasa de cambio durante el proceso de aplicación y secado del cosmético, y se define por la siguiente fórmula 1):

Tasa de cambio de espesor del estrato córneo (%) =

$$(B - A) \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C \quad (1),$$

45 en donde A es el espesor de las células o de una capa de células de estrato córneo seleccionada del grupo que consiste en un estrato córneo aislado y una capa de estrato córneo cultivado, B es el espesor de las células o de una capa de células del estrato córneo en estado húmedo después de la aplicación del cosmético, y C es el espesor de las células o de una capa de células del estrato córneo tras el secado. Por lo tanto, el método para evaluar los cosméticos de acuerdo con la invención comprende preferiblemente los siguientes pasos:

50 una etapa en la que se mide el espesor (A) de las células o de una capa de células del estrato córneo seleccionado del grupo que consiste en, un estrato córneo aislado y una capa del estrato córneo cultivado antes de la aplicación de un cosmético;

una etapa en la que se mide el espesor (B) de las células o de una capa de células en estado húmedo después de aplicar el cosmético al estrato córneo;

una etapa en la que se mide el espesor (C) de las células o de una capa de células en estado seco tras secar el estrato córneo;

una etapa en la que se calcula la tasa de cambio de espesor del estrato córneo durante el proceso de hidratación y secado del estrato córneo, por medio de la fórmula 1);

5 una etapa en la que se determina que el cosmético tiene un efecto de mejora de la piel si la tasa de cambio de espesor del estrato córneo es de 20% a 50%. Preferiblemente, se considera que se ha obtenido un efecto de mejora en la piel si el límite inferior para el intervalo de la tasa de cambio de espesor del estrato córneo se selecciona del grupo que consiste en 20%, 25%, 30% y 40%, y si el límite superior se selecciona del grupo que consiste en 100%, 120%, y 150%.

10 En la presente invención "estrato córneo" se refiere a una preparación "in vivo" de la piel, o un estrato córneo obtenido a partir de cultivo celular, principalmente un estrato córneo aislado y una capa de estrato córneo cultivado.

"Estrato córneo de la piel" se refiere específicamente al estrato córneo de la piel humana, y cuando en la presente memoria se utiliza el término "estrato córneo de la piel" se refiere a un método "in vivo" en el que el cosmético se aplica directamente sobre el estrato córneo de la piel de un organismo. La ubicación de la piel puede ser cualquier sitio o zona del cuerpo, tal como la mejilla, la barbilla, el dorso de la mano o el tronco.

15 El "estrato córneo aislado" se puede obtener por un método invasivo, tal como medios quirúrgicos, pero con el propósito de valorar un cosmético, preferiblemente se obtiene a partir de la piel mediante un método no invasivo, por razones de facilidad o éticas. Los métodos no invasivos incluyen los métodos de extracción con cinta adhesiva y dermoabrasión que se emplean comúnmente en el campo técnico (NPL 1). La extracción con cinta adhesiva se puede llevar a cabo aplicando una tira de cinta adhesiva o un Post-It (producto de Sumitomo-3M) a la capa superficial de la piel y despegándola para separar el estrato córneo de la piel directamente en la cinta adhesiva, y este es el método especialmente preferido para el propósito de la invención.

20 Un método de extracción con cinta adhesiva preferido es aquel en el que la superficie de la piel se cubre primero con una tira de cinta adhesiva o Post-it cortado a un tamaño adecuado (por ejemplo, 5 x 5 cm) colocado ligeramente sobre la superficie de la piel, y se aplica una fuerza igual en toda la cinta para aplanarlo, después de lo cual la cinta adhesiva se despega con una fuerza uniforme. La cinta adhesiva usada puede ser cinta de celofán disponible comercialmente, y, por ejemplo, puede ser Scotch Superstrenght Mailing Tape (3M) o similares. También, el Post-it utilizado puede ser cinta para cubrir de Sumitomo-3M o similar.

25 Una capa de estrato córneo cultivado es una capa de estrato córneo obtenida por cultivo "in vitro", e incluye capas de estrato córneo aislado a partir de tejido de piel cultivado y mantenido cultivando piel humana o de animales experimentales, y capas del estrato córneo obtenidas a partir de la piel cultivada tridimensionalmente obtenida mediante el cultivo de fibroblastos o de fibroblastos diferenciados "in vitro" a partir de células madre (por ejemplo, células madre epiteliales, células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas), en un soporte de cultivo compuesto por un polímero como colágeno, fibrina o ácido poliláctico, o un polisacárido como la quitina, quitosano, sulfato de condroitina o ácido hialurónico. La capa de estrato córneo se aísla del tejido epitelial cultivado en el soporte mediante un método como el tratamiento con una proteasa en una disolución salina fisiológica con concentraciones de iones calcio y de iones magnesio controladas. La piel cultivada tridimensionalmente utilizada puede ser un modelo de epidermis humana cultivada en tres dimensiones producto comercialmente disponible de LabCyte EPI-MODEL (Japón Tissue Engineering).

30 Además se describe un método para evaluar el uso de un cosmético basado en el índice de cambio de espesor del estrato córneo. Específicamente, el método para evaluar el método de la utilización de un cosmético comprende las siguientes etapas:

45 una etapa en la que se mide el espesor (A) de las células o de una capa de células del estrato córneo seleccionado del grupo que consiste en un estrato córneo de la piel, un estrato córneo aislado y una capa de estrato córneo cultivado antes de la aplicación de un cosmético;

una etapa en la que se mide el espesor (B) de las células o de una capa de células en el estado húmedo;

una etapa en la que se mide el espesor (C) de las células o de una capa de células en estado seco; y

una etapa en la que se calcula la tasa de cambio de espesor del estrato córneo durante el proceso de secado después de que el estrato córneo ha sido hidratado, por medio la siguiente fórmula 1:

50 Tasa de cambio de espesor del estrato córneo (%) =

$$(B - A) \times 100/A - (C - B) \times 100 / C (1).$$

Se obtiene un efecto de mejora sobre la piel por el uso del cosmético si el cambio de espesor del estrato córneo es superior al 20%. Más preferiblemente, se puede determinar que el uso del cosmético es adecuado cuando la tasa de cambio de espesor del estrato córneo es mayor que 20%, mayor que 25%, mayor que 30%, mayor que 40% o mayor

que 50%. No hay restricciones particulares sobre el límite superior, pero desde el punto de vista del límite de hinchazón, se selecciona preferiblemente de entre menos que 100%, menos que 120%, menos que 150% y menos que 200%. Los métodos para evaluar los métodos de utilización de los cosméticos, en los que los cosméticos se aplican al estrato córneo de la piel, se emplean en los salones de belleza, tiendas de cosméticos y salones de estética.

El espesor del estrato córneo es generalmente el espesor de la capa de células del estrato córneo, pero desde el punto de vista de la medición de la tasa de cambio del espesor del estrato córneo, la tasa de cambio del espesor del estrato córneo se puede medir comparando no sólo el espesor de la capa de células del estrato córneo, sino también el espesor de una célula en el estrato córneo. El espesor del estrato córneo se puede medir usando cualquier método deseado utilizado convencionalmente, como un microscopio fluorescente o un microscopio de fuerza atómica (PTL 4 y NPL 1). Como alternativa se puede usar un microscopio láser de barrido multifotónico o un biomicroscopio confocal, o similares. Más específicamente, cuando se va a medir el espesor de la célula de estrato córneo aislado, se pueden usar un microscopio de fluorescencia o un microscopio de fuerza atómica para medir la longitud desde la membrana celular hasta la membrana celular en la dirección del espesor de las células de forma plana del estrato córneo, permitiendo de ese modo medir el espesor de las células en el estrato córneo aislado. Del mismo modo, el espesor de la capa de células de estrato córneo se puede medir como el espesor de la capa de células del estrato córneo aislado, mediante la medición de la longitud de las membranas celulares desde las células de la capa más inferior de las células del estrato córneo que forman las capas del estrato córneo aislado, hasta las membranas celulares de las células de la capa superior.

En la presente memoria, "cosmético" se refiere a un cosmético para ser aplicado a la piel, tal como el agua cosmética, látex, esencia, crema, base o similares, pero no se limita a estos. Incluye todas las sustancias que no tienen como finalidad directa mejorar la piel, pero que se aplican sobre la piel y, por ejemplo, incluye los filtros solares, repelentes de insectos, agentes para la alopecia y recuperadores del cabello.

Además se describe un método para evaluar los cosméticos adecuados para un hábitat determinado. Específicamente, se refiere a un método para evaluar los cosméticos que son adecuados para un hábitat determinado, el método comprende:

(1) una etapa en la que se aplica un cosmético al estrato córneo seleccionado del grupo que consiste en un estrato córneo de la piel, un estrato córneo aislado y una capa de estrato córneo cultivado;

(2) una etapa de secado del cosmético a una temperatura prescrita y a una humedad prescrita;

(3) una etapa en la que se mide el contenido de humedad (%) y la transmitancia del estrato córneo (%) en la etapa de secado, creando de ese modo un diagrama de cajas y la obtención de una curva ajustada;

(4) una etapa en la que se determina si la curva ajustada obtenida en la etapa anterior está o no dentro de un intervalo entre una curva ajustada obtenida en una etapa de aplicación de agua al estrato córneo seleccionado del grupo que consiste en un estrato córneo de la piel, un estrato córneo aislado y una capa de estrato córneo cultivado (que no contiene melanina) y el secado en las condiciones de la temperatura prescrita y al menos 30% y menos que 90% de humedad, y preferiblemente al menos 60% y menos que 90% de humedad, y una curva ajustada obtenida en una etapa de secado en las condiciones de la temperatura prescrita y 90% de humedad; y

(5) una etapa en la que se evalúa que el cosmético es adecuado para el hábitat prescrito si la curva ajustada está contenida dentro del rango.

Puesto que no había diferencia significativa en la función de barrera de la piel entre el secado a 60% de humedad y el secado a 90% de humedad (Fig. 9), se puede considerar que un cosmético puede ser adecuado para un ambiente en particular, incluso cuando el método incluye, en lugar de las etapas (4) y (5) una etapa en la que se evalúa si el cosmético es adecuado para el hábitat en particular, si la transmitancia total del estrato córneo es mayor que 85%, lo que corresponde a la transmitancia total del estrato córneo en el punto final de secado, cuando el secado ha tenido lugar en las condiciones de temperatura prescritas y 60% de humedad. En este caso, la transmitancia del estrato córneo es preferiblemente mayor que 90%.

La velocidad de secado del cosmético puede variar dependiendo de la cantidad y la concentración de los componentes que contiene. Los componentes del cosmético pueden incluir agua o alcoholes tales como etanol, glicerina o polietilenglicol como bases, aminoácidos tales como glicina, betaína, pirrolidona carboxilato de sodio o sacáridos tales como fructosa, maltitol, manitol o trehalosa, como humectantes, ácido hialurónico, colágeno, ceramida o similares como ingredientes activos, citrato de sodio, ácido cítrico o de lactato de sodio como agentes de dilución, y sales de ácido benzoico o ácido sórbico como agentes antisépticos, pero no se limita a éstos. De éstos, los componentes volátiles aumentan la velocidad de secado, mientras que los solutos, y especialmente las sustancias hidrófilas tales como los polímeros, incluyendo el polietilenglicol, reducen la velocidad de secado, y por lo tanto la selección de estos componentes y sus cantidades alteran la velocidad de secado del cosmético obtenido por la formulación. El método permite evaluar si el cosmético obtenido mediante la formulación de estos componentes es adecuado para el hábitat de la región en la que se va a comercializar o no.

En la presente memoria, el hábitat de una región de comercialización es el hábitat de la región en la que el cosmético va a ser comercializado, y por ejemplo, se refiere al clima, y en particular a la temperatura y la humedad, que también varía ampliamente dependiendo de la estación de la región de comercialización. Por lo tanto, de acuerdo con una realización más preferida de la invención, es posible evaluar si un cosmético es adecuado para las diferentes estaciones de la región de comercialización, por ejemplo, para la estación seca o para la estación lluviosa, o para las estaciones de primavera, verano, otoño o invierno.

La función de barrera de la piel se evalúa mediante la pérdida de agua transepidermica (TEWL). La TEWL es la cantidad de transpiración de humedad a través del estrato córneo, una TEWL baja indica una función de barrera del estrato córneo de la piel mayor y una TEWL alta indica que una función de barrera del estrato córneo de la piel inferior. La relación entre la función barrera de la piel y la rugosidad de la piel se describe en PTL 2.

A continuación se proporcionan ejemplos concretos para una explicación más detallada de la invención. Sin embargo, la invención no está, en modo alguno, limitada por los ejemplos.

Ejemplo 1: Evaluación de la transparencia del estrato córneo en relación con el contenido de humedad del estrato córneo

(Preparación de la muestra del estrato córneo)

Un modelo de cultivo tridimensional de epidermis humana (LabCyte EPI-MODEL, Japón Tissue Engineering) se incubó en una placa de 12 pocillos durante 30 minutos a 37° C en una disolución de tripsina al 0,1% / tampón fosfato isotónico, para preparar una capa de estrato córneo con un diámetro de 10 mm aproximadamente. Cada capa de estrato córneo se secó a una temperatura de 34° C utilizando un termohigrostat MTH-2200 (Sanyo Electric Co., Ltd.), para obtener capas de estrato córneo con diferentes contenidos de humedad del estrato córneo.

(Método de medición del contenido de humedad del estrato córneo)

El peso húmedo del estrato córneo, cuyo contenido de humedad interesa, se mide con un Mettler o similar. Se elimina la electricidad estática, si fuera necesario con un ionizador (STABLO, Shimadzu Corp., Nagoya, Japón). Se lleva a cabo la medición del peso cada segundo durante 1 minuto, y se registra el valor promedio. A continuación, se mide el peso seco absoluto del estrato córneo. Específicamente, el estrato córneo se calienta a 120 grados durante 2 horas para eliminar la mayor parte de la humedad. A continuación, se lleva a un estado seco absoluto con un equipo de adsorción/desorción de la humedad (IGAsorp, Hiden Isochema Ltd., WA, Reino Unido), mientras que se circula un flujo de gas nitrógeno con 0% de humedad durante 2 horas, y se mide el peso seco absoluto del estrato córneo a 0% de humedad con un equipo de adsorción/desorción de la humedad. El contenido de humedad del estrato córneo, se calcula basándose en la siguiente fórmula.

Contenido de humedad del estrato córneo (%) =

$$\left(\frac{\text{peso estrato córneo húmedo} - \text{peso seco absoluto del estrato córneo}}{\text{peso estrato córneo húmedo}} \right) \times 100$$

(Medición de la transmitancia total del estrato córneo)

El aparato de medición de transparencia de la invención comprende una fuente de luz blanca como fuente de luz estándar de calificación C de acuerdo con la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage), un dispositivo de sujeción para la muestra del estrato córneo, una pantalla como escudo para que la luz que no pase a través de la muestra del estrato córneo, una esfera de integración que homogeniza luz que ha pasado a través de la muestra del estrato córneo, y un fotómetro que mide la intensidad de la luz guiada desde la esfera de integración. Después de medir el contenido de humedad del estrato córneo, la capa del estrato córneo se monta en un equipo de medición de transparencia de acuerdo con la invención y se irradia con la luz blanca de la fuente de luz, la luz que pasa a través de la capa del estrato córneo se dirige a la esfera de integración, y se mide la intensidad de la luz homogeneizada. Los resultados para el valor de la transmisión total medido, es decir, la intensidad de la luz que ha pasado a través de la capa de estrato córneo, se expresan como un porcentaje, dividido por el valor medido para la intensidad de la luz blanca guiada directamente desde la fuente de luz hacia la esfera de integración, en un estado en blanco sin montar de la capa de estrato córneo (Fig.1)

Ejemplo 2: Evaluación de la función de barrera de la piel del estrato córneo en relación con el contenido de humedad del estrato córneo

(Medición de la transpiración de la humedad del estrato córneo)

La capa de estrato córneo seco se monta en una célula de Frank (PermeGear, Inc., EE.UU.). El lado del receptor de la capa de estrato córneo se pone a remojo con agua mientras que el lado donador se mantuvo vacío, exponiendo de esta forma, el lado superior de la capa del estrato córneo a una fase de gas y el lado inferior a una fase líquida, con la capa del estrato córneo situada en la interfaz gas-líquido. Dos horas después de la estabilización de la

transpiración de la humedad del estrato córneo, se utilizó un VapoMeter (Delfin Technologies Ltd., Finlandia) para medir la transpiración de la humedad en el modo de uña (Fig. 2).

Ejemplo 3: Evaluación del orden de los lípidos en el estrato córneo en relación con el contenido de humedad del estrato córneo,

5 (Preparación de la muestra de estrato córneo)

Un modelo de cultivo tridimensional de epidermis humana (Labcyte EPI-MODEL, Japón Tissue Engineering) se incubó en una placa de 12 pocillos durante 30 minutos a 37° C en una disolución de tripsina al 0,1% / tampón fosfato isotónico para preparar una capa de estrato córneo con un diámetro de 10 mm aproximadamente.

(Reacción con 5DSA)

10 La capa de estrato córneo se adhirió a una placa de vidrio (8 mm × 70 mm × 0,5 mm) y se trató con 50 ml de 0,001% de ácido 5-doxil-esteárico (5-DSA; producto de Aldrich) como sonda de espín, se hizo reaccionar a 37° C durante 1 hora y luego se enjuagó con agua.

(Medición de ESR)

15 Se utilizó un MTH-2200 para la incubación de la capa de estrato córneo, a 34° C, 60% de humedad, y la medición del ESR se realizó a las 0 horas, 30 minutos, 1 hora, 1,5 horas, 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 5 horas y 18 horas desde el inicio de la incubación. La medición se llevó a cabo a temperatura ambiente usando un equipo de ESR en banda X (JESREIX, producto de JEOL Corp.). Se realizó un análisis de datos para determinar el grado de orden S por el método geométrico utilizado convencionalmente.

20 Las condiciones de medición fueron las siguientes. Salida de microondas: 10 mW, amplitud de modulación de campo: 0,2 mT, constante de tiempo: 1 segundo, tiempo de barrido: 8 minutos.

25 En base a los resultados del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2, se mostró un aumento de la transparencia y de la función de barrera del estrato córneo con la disminución del contenido de humedad del estrato córneo. Además, según los resultados del Ejemplo 3, el grado de orden de los lípidos intercelulares mejora cuando el contenido de humedad del estrato córneo disminuye. Esto se debe a que la estructuración de los lípidos a medida que avanza el secado, da como resultado una mayor estabilidad del estrato córneo. Esto demuestra que es necesaria la reducción desde un estado hidratado suficientemente hasta un contenido de humedad del estrato córneo adecuado, para que la piel tenga una transparencia alta (belleza) y una función de barrera de la piel alta (piel sana).

Ejemplo 4: Evaluación del efecto de hidratación del agua en la transparencia del estrato córneo

30 Utilizando el método para medir la transparencia del estrato córneo del Ejemplo 1, se midió la transparencia del estrato córneo con las siguientes muestras: una capa de estrato córneo hidratada con agua, una capa de estrato córneo hidratada con agua y secada posteriormente durante 18 horas en las condiciones de 34 grados, 60% de humedad utilizando un baño termostático (MTH-2200, Sanyo Electric, Tokio, Japón), una capa de estrato córneo hidratada con agua, congelada a -20 grados con un equipo de liofilización (VD-80, producto de Taitec) y liofilizada a continuación durante 2 horas con el mismo equipo, y una capa de estrato córneo hidratada con agua y sometida posteriormente a la misma de liofilización, seguida de rehidratación con agua y de secado posterior durante 18 horas en condiciones de 60% de humedad (Fig. 4). La hidratación con agua y la rehidratación con agua se llevaron a cabo mediante la colocación en agua durante 18 horas.

Ejemplo 5: Evaluación del efecto de hidratación de agua en el estrato córneo en la función barrera de la piel

40 Utilizando el método para medir la función barrera de la piel del Ejemplo 2, se midió la transparencia del estrato córneo con las siguientes muestras: una capa del estrato córneo hidratado con agua, una capa estrato córneo hidratado con agua y después secado durante 18 horas en las condiciones de 34° C, 60% de humedad, una capa del estrato córneo hidratado con agua, congelado a -20° C con un equipo de liofilización (VD-80, producto de Taitec) y después se liofilizó durante 2 horas con el mismo dispositivo, y una capa estrato córneo hidratado con agua y después sometido a secado por congelación de la misma manera, rehidratado con agua y luego secado en las condiciones de 34° C, 60% de humedad. La hidratación con agua y rehidratación con agua se llevó a cabo mediante la colocación en agua durante 18 horas.

50 A juzgar por los experimentos de los Ejemplos 4 y 5, la rehidratación con agua y el secado del estrato córneo, dañados por liofilización restauraron tanto la transparencia como la función de barrera de la piel del estrato córneo al mismo nivel que el estado seco a 60% de humedad en lugar de liofilización, lo que indica que la hidratación con el agua y el secado mejora la condición de la piel.

Ejemplo 6: Evaluación de los reactivos para mejorar los efectos sobre la piel en función del cambio de grosor del estrato córneo

El espesor de un Modelo de Epidermis humana reconstituida J-TEC (capa de estrato córneo,) se midió antes del experimento con un calibrador (Caliper No.227-201 de Mitsutoyo Corp.) (cada uno una localización) (A). La capa de estrato córneo se hidrata adicionalmente durante 30 minutos en una solución acuosa de glicerina al 10%, una solución acuosa de parafina líquida (10%), glicerina (10%), POE (60) aceite de ricino hidrogenado (10%), polímero de carboxivinilo (nombre del producto: CARBOPOL 981, Lubrizol Advanced Materials, Inc.) (0,2%) y KOH (0,1%) (parafina líquida+ glicerina + disolución acuosa espesante), y en etanol al 100%, e inmediatamente después de la finalización de la hidratación, se midió el espesor de la capa de estrato córneo con un calibre de la misma manera (B).

Se secó adicionalmente durante 18 horas en las condiciones de 34° C, 60% de humedad y se midió la capa del estrato córneo (C). Utilizando estos resultados, se mide la tasa de cambio de espesor (%) de la capa del estrato córneo en base a la siguiente fórmula 1:

Tasa de cambio de espesor % =

$$(B - A) \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C$$

Tras el posterior secado, se examinó visualmente la transparencia de la capa del estrato córneo. Los resultados para el cambio de espesor y la transparencia de la capa del estrato córneo se muestran en la Tabla 1.

(Tabla 1)

Muestra	Tasa de cambio de espesor (%)	Transparencia
Solución glicerina 10%	88,4	Buena
Parafina líquida+ glicerina+ disolución espesante	29,9	Buena
Etanol 100%	3,9	Baja

A continuación, un modelo de Epidermis humana reconstituida J-TEC (capa de estrato córneo,) se sometió a liofilización para obtener una capa de estrato córneo opaca de color blanco. La capa de estrato córneo liofilizado se humedeció durante 30 minutos en una solución acuosa de glicerina al 10%, en una solución acuosa de parafina líquida (10%), glicerina (10%), POE (60) aceite de ricino hidrogenado (10%), polímero de carboxivinilo (nombre del producto: CARBOPOL 981 por Lubrizol Advanced Materials, Inc.) (0,2%) y KOH (0,1%) (parafina líquida + glicerina + disolución acuosa espesante), y en etanol al 100%, y después de eliminar el líquido, se llevó a cabo el secado durante 18 horas en una atmósfera a 34° C, 60% de humedad, y la capa fue fotografiada (fig. 7).

Se obtuvo un estrato córneo con alta transparencia cuando la humectación se llevó a cabo en la solución acuosa de glicerina 10% o en parafina líquida + glicerina + disolución acuosa espesante, pero se obtuvo una capa córnea todavía con baja transparencia cuando la humectación era con parafina líquida. La transmitancia se midió usando un espectrofotómetro HR100 de Murakami Color de Research Laboratory Co., Ltd. La comparación con la Tabla 1 muestra que el estrato córneo de transparencia alta, se obtiene cuando el cambio de espesor del estrato córneo es por lo menos del 20%. Puesto que una mayor transparencia del estrato córneo se puede considerar una condición más excelente de la piel, el estado de mejora de la piel se puede evaluar basándose en el cambio de espesor de las células o de la capa de células del estrato córneo, desde la hidratación en un líquido hasta el secado.

Ejemplo 7: Cambio en la transparencia del estrato córneo en base a la humedad de la etapa de secado

La etapa de secado en el experimento del Ejemplo 1 se realizó a un 30% y 60% de humedad y a un 90% de humedad, para representar la transmitancia total de estrato córneo frente al contenido de humedad (%) (Fig. 8). La Fig. 8 muestra que el secado a humedad alta da como resultado la mayor mejoría de la transparencia del estrato córneo. Este experimento respalda el uso de un método para evaluar los cosméticos que son adecuados para determinados hábitats. En otras palabras, cuando la transmitancia (%) del estrato córneo, se representa frente al contenido de humedad (%) obtenido en la etapa de secado de un cosmético de ensayo, a una humedad y temperatura prescrita, y se dibuja un diagrama de trama y se obtiene una curva ajustada, se evalúa que el cosmético sea adecuado para la mejora de la transparencia del estrato córneo, si la curva ajustada esta incluida dentro de la región entre una curva ajustada (1) obtenida en la etapa de aplicación de agua a la capa córnea y el secado en las condiciones de temperatura prescritas antes mencionadas y en por lo menos 30% y menos que 90% de humedad, y una curva ajustada (2) obtenida en la etapa de secado en condiciones de temperatura prescritas mencionadas anteriormente y 90% de humedad. Se puede evaluar como un cosmético aún más adecuado cuando el límite inferior

para la humedad en las condiciones en que se obtiene la curva ajustada (1), es un límite inferior seleccionado de entre el grupo que consiste en 60%, 70% y 80%.

Ejemplo 8: Cambio en la función barrera de la piel del estrato córneo en base a la humedad en la etapa de secado

- 5 La etapa de secado en el experimento del Ejemplo 2 se llevó a cabo con humedades de 30%, 60% y 90%, y se midió la transpiración de humedad (Fig. 9). Este gráfico muestra que la función de barrera de la piel del estrato córneo se mejora cuando el secado se realiza a alta humedad, mientras que el efecto sobre la función barrera de la piel era bajo cuando el secado era de 60% o de 90% de humedad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar un cosmético, en donde la tasa de cambio de espesor del estrato córneo durante el proceso de hidratación del estrato córneo con el cosmético y posterior secado del estrato córneo se utiliza como un índice, cuyo método de evaluación comprende las etapas siguientes:
 - 5 medir el espesor (A) de las células o de una capa de células del estrato córneo seleccionada del grupo que consiste en estrato córneo aislado y una capa de estrato córneo cultivada;

aplicar el cosmético a la célula o a la capa de células del estrato córneo con el fin de proporcionar estrato córneo hidratado;

medir el espesor (B) de las células o de una capa de células del estrato córneo hidratado;
 - 10 secar la célula o la capa de células del estrato córneo hidratado con el fin de proporcionar estrato córneo seco;

medir el espesor (C) de las células o de una capa de células del estrato córneo seco;

calcular la tasa de cambio del espesor del estrato córneo durante el proceso de hidratación, y posterior secado del estrato córneo, donde dicho cálculo se lleva a cabo utilizando la fórmula siguiente (1) :
 - 15
$$\text{tasa de cambio de espesor del estrato córneo} = \frac{(B - A) \times 100}{A} - \frac{(C - B) \times 100}{C} \quad (1); \text{ y}$$

determinar que el cosmético tiene un efecto de mejora en la piel si la tasa de cambio de espesor del estrato córneo es de 20% a 150%.
2. El método según la reivindicación 1, donde se determina que el cosmético tiene un efecto de mejora en la piel si la tasa de cambio de espesor del estrato córneo es de 25% a 100%.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, donde el efecto de mejora en la piel es un efecto de mejora de la transparencia del estrato córneo.

Fig.1

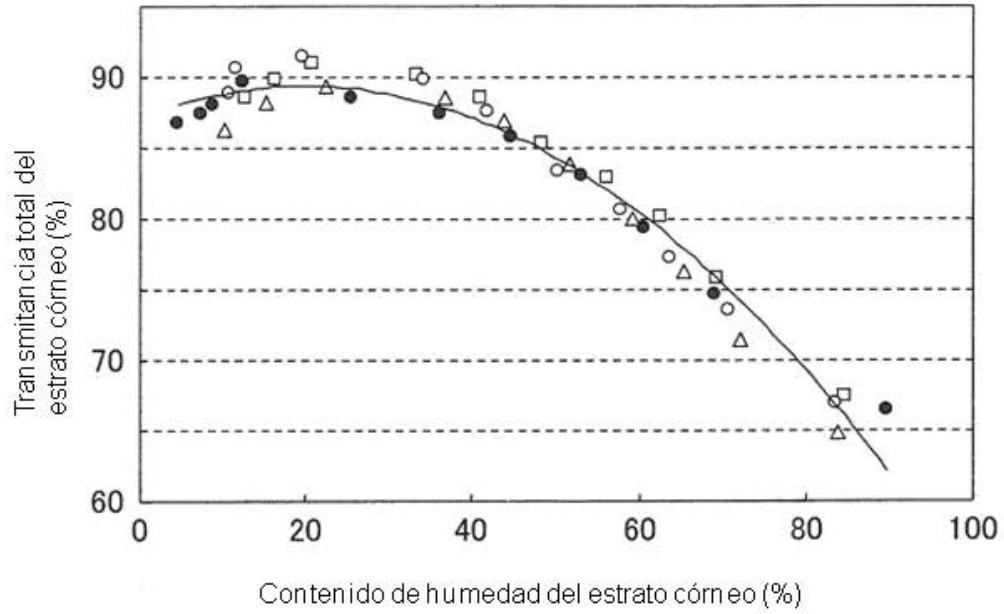


Fig.2

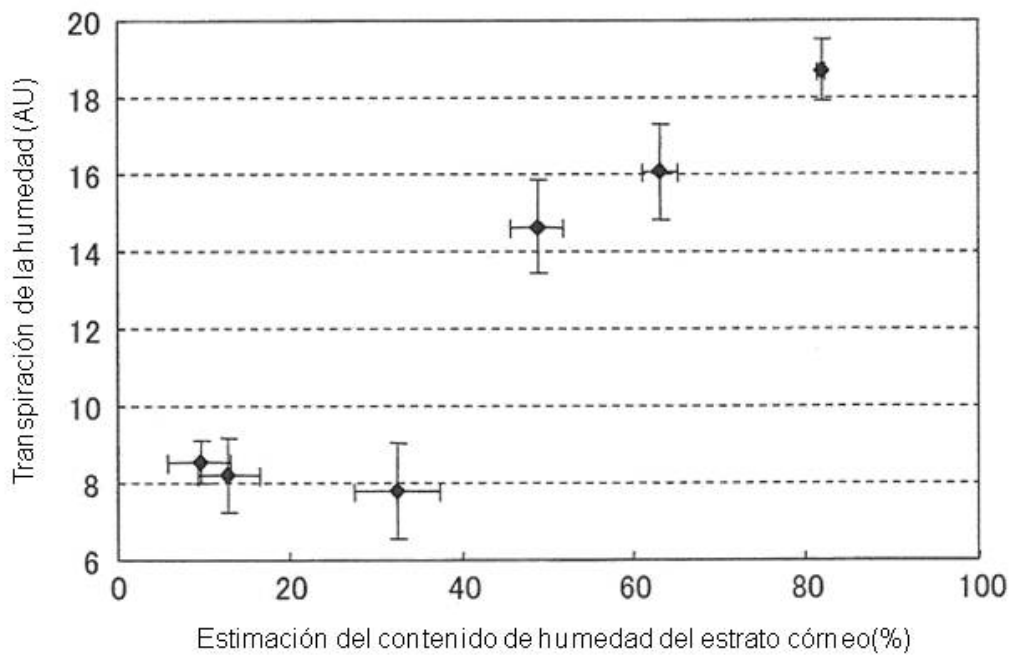


Fig.3

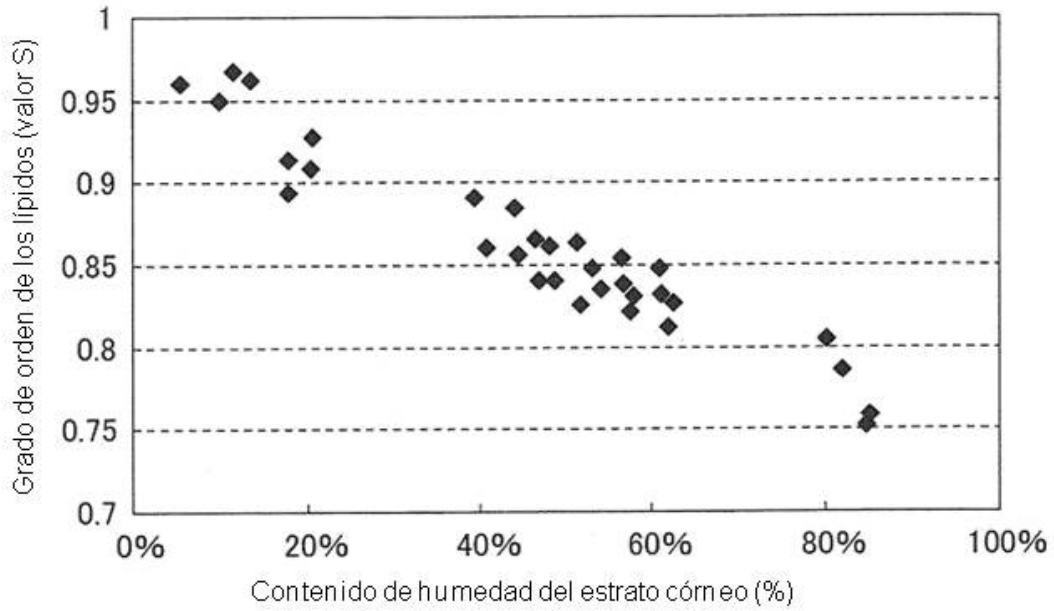


Fig.4

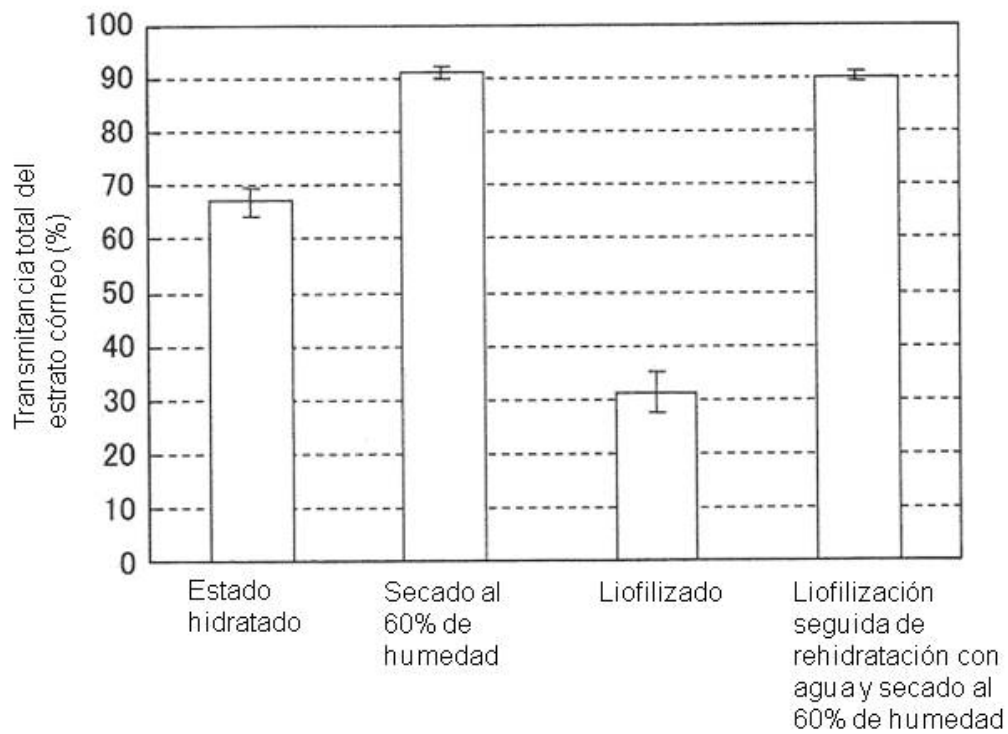


Fig.5

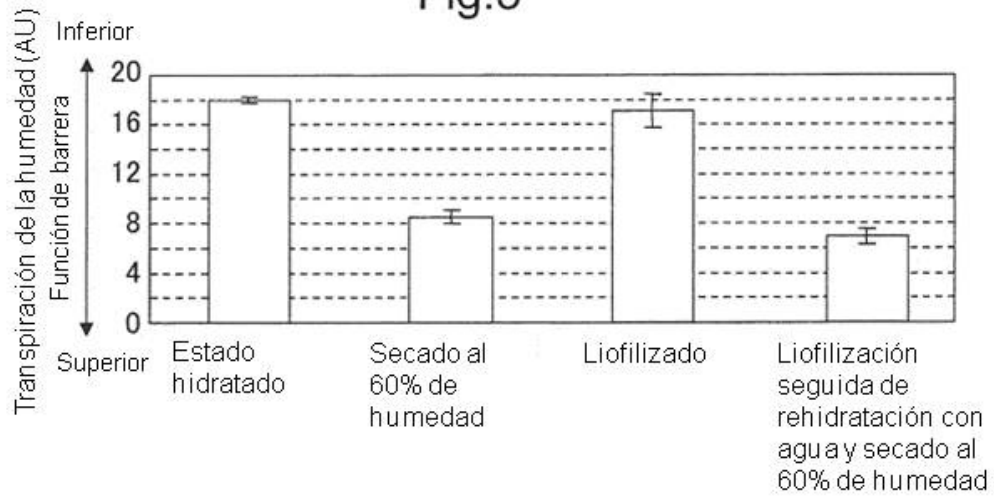


Fig.6

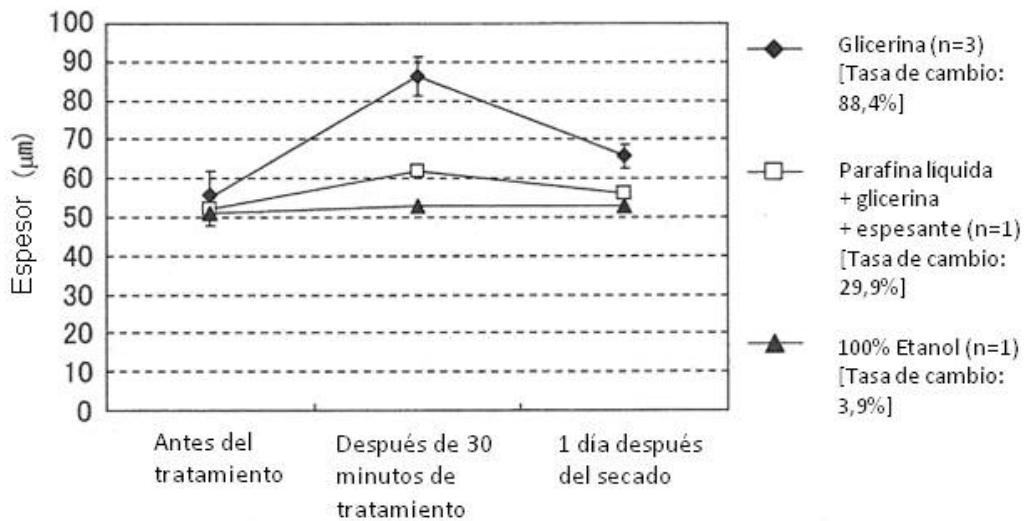


Fig.7

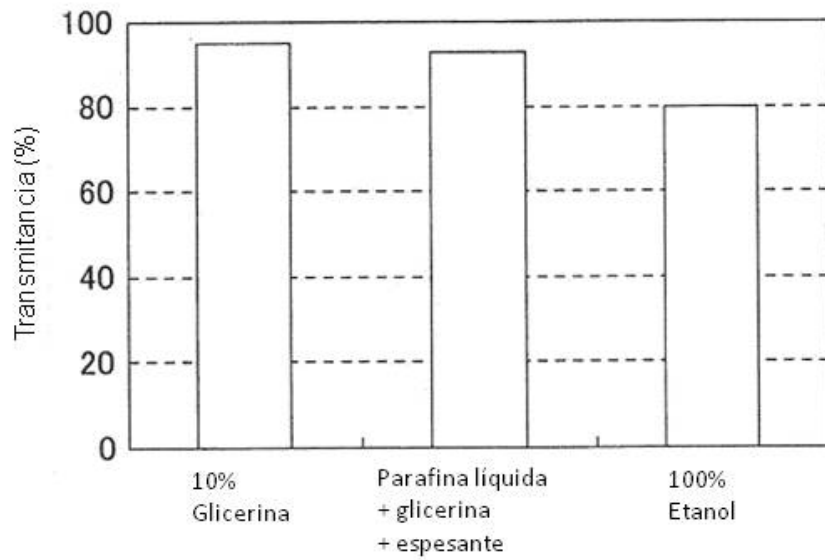
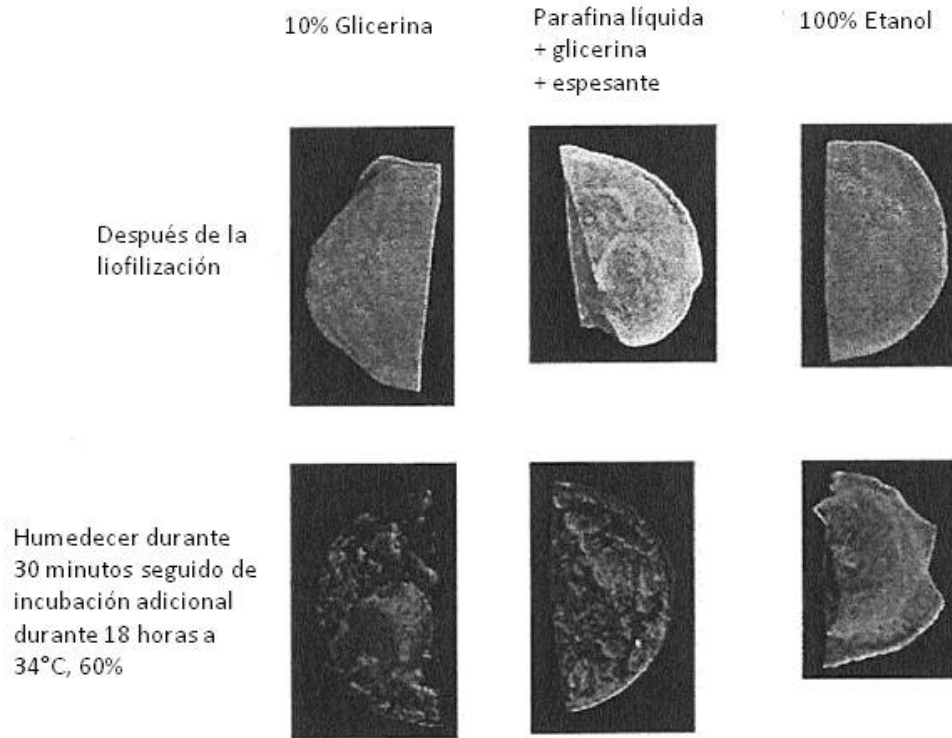


Fig.8

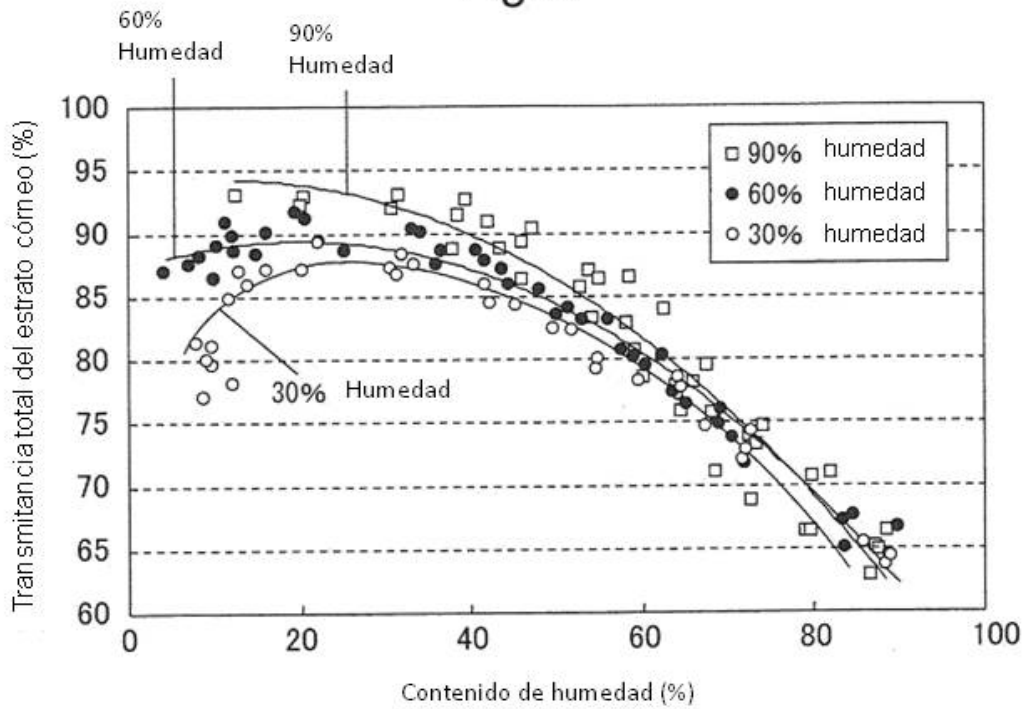


Fig.9

