

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 516**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A61K 8/67 (2006.01)

A61K 8/37 (2006.01)

A61K 8/97 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2009 PCT/US2009/031538**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2009 WO09094374**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2009 E 09703733 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2247949**

54 Título: **Procedimiento de selección de antioxidantes para su uso en composiciones aplicadas tópicamente**

30 Prioridad:

25.01.2008 US 23713
14.11.2008 US 114758

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

13.10.2017

73 Titular/es:

BAYER CONSUMER CARE AG (100.0%)
Peter Merian-Strasse 84
4052 Basel, CH

72 Inventor/es:

MEYER, THOMAS, A. y
BEASLEY, DONATHAN, G.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 637 516 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

Procedimiento de selección de antioxidantes para su uso en composiciones aplicadas tópicamente

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, generalmente, a procedimientos de seleccionar antioxidantes para la inclusión en composiciones aplicadas tópicamente a la piel y el cabello para protección contra la radiación ultravioleta.

Antecedentes de la invención

10 La exposición de la piel a la radiación ultravioleta (UVR, pos sus siglas en inglés) induce la formación de radicales libre y oxidantes (oxígeno sencillo, radical hidroxil, peróxido de hidrógeno, peroxinitrato, aniones de superóxido, etc.) colectivamente referidos como especies de oxígeno reactivo (ROS, por sus siglas en inglés) (Hanson KM, Clegg RM. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 76(1): 57-63; Black HS. *Photochem. Photobiol.* 1987, 46, 213-221). La formación de ROS que induce UV provoca daño oxidante a los lípidos, proteínas y ADN (Vile GF y Tyrrell RM. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995, 18, 721-722; Chen Q, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1995, 92, 4337-4341).

15 Bajo circunstancias normales, los niveles bajos de ROS se neutralizan por defensas de antioxidante constitutivas de la piel. Sin embargo, las investigaciones han mostrado que aún las dosis suberitémicas de UVR genera tal abundancia de ROS que las defensas de antioxidante propias de la piel se abruma, lo que resulta en la construcción de ROS que están libres para provocar oxidación, lo que contribuye a formas aguda (trastornos de inmunosupresión y fotosensibilidad) y crónica (fotoenvejecimiento y cáncer de la piel) (Thiele JJ, et al. *J. Invest. Dermatol.*, 1998, 110(5), 756-761; Sander C.S, et al. *J. Invest. Dermatol.*, 2002, 118 (4), 618-625; Thiele J.J: *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 2001, 14 (suppl. 1), 87-91; Sander CS, et al. *International Soc. Dermatol.*, 2004, 43, 326-335). La EP 1591104 (STADA Pharmaceuticals AG) describe el uso de antioxidantes en formulaciones farmacéuticas para la protección contra radiación infrarroja.

20 Los antioxidantes (Aox) funcionan neutralizando ROS. Si se presentan el tipo y nivel adecuado dentro de la piel donde se forman ROS, los Aox serán capaces de neutralizar ROS antes de que puedan atacar u oxidar otras biomoléculas. En consecuencia, debería ser útil tener un procedimiento para determinar que antioxidantes de aplicación tópica puede ser altamente efectivos en neutralizar las especies de oxígeno reactivo inducidas por UVR (ROS) dentro de la piel. Además, sería útil tener un procedimiento para distinguir los compuestos que pueden ser efectivos solo en solución para depurar radicales libres de compuestos que pueden ser antioxidantes altamente efectivos en la piel cuando se exponen a UVR. Además, sería útil tener un procedimiento para determinar la elección correcta y el nivel de uso de antioxidantes en productos de bloqueador solar para proporcionar protección extra
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

En consecuencia la invención descrita en el presente documento proporciona, entre otras cosas, un procedimiento que comprende dos procedimientos ex vivo únicos para evaluar la capacidad de aplicar tópicamente Aox para proporcionar protección contra la formación de ROS inducido por UVR dentro de las capas exteriores de la piel. El primer procedimiento usa microscopio, por ejemplo, microscopio fluorescente, para formar imágenes y cuantificar la formación de ROS en las capas interiores de la epidermis, por ejemplo, a través de la capa basal, al formar imágenes de sección de piel humana. El segundo procedimiento cuantifica la extensión a la cual la composición que contiene Aox inhibe la peroxidación de lípidos en las capas exteriores de la piel. Esta especificación también demuestra que una prueba de laboratorio comúnmente usada para medir la eficacia de los antioxidantes en la solución para depurar los radicales libres no es predictiva de una capacidad del Aox para funcionar efectivamente en sustratos biológicos más complejos tipo piel expuesta a UVR. De esta manera, la presente invención proporciona una ventaja sobre los procedimientos del arte previo para seleccionar Aox para usar en productos de bloqueador solar para asegurar que proporcionan un beneficio protector.

La identificación o discusión de cualquier referencia en esta sección o cualquier parte de esta especificación no debería construirse como una admisión de que tal referencia está disponible como arte previo para la presente solicitud.

Breve descripción de la invención

En el presente documento se describe un procedimiento para confirmar la actividad antioxidante de una composición formulada para aplicación tópica a la piel, en el que el procedimiento comprende probar la composición para la capacidad para inhibir formación de especies de peroxidación de lípido inducida por radiación ultravioleta en la piel como oxígeno reactivo inducido por radiación ultravioleta a través de la epidermis.

La presente invención proporciona un procedimiento ex vivo para seleccionar compuestos por su comportamiento antioxidante en una composición para aplicar tópicamente a la piel, en el que el procedimiento de selección comprende determinar la capacidad del compuesto para inhibir la formación de tanto hidroperóxido de lípido en la piel inducido por la radiación ultravioleta como de especies de oxígeno reactivo inducido por la radiación ultravioleta

a través de la epidermis.

En el documento US 6.254.898 B1 se describe el uso de un experimento en el que la actividad secuestrante de radicales libres de una mezcla y sus componentes se determinó *in vitro* usando ensayos espectrofotométricos.

5 En el documento US 2007/0140996 A1 se menciona un ensayo por el cual se investigaron las propiedades espectrales de un filtro solar-antioxidante, su capacidad para prevenir la generación de especies de oxígeno reactivas inducidas por UV medida como daño fotooxidativo reducido a los lípidos y su efecto en presencia del filtro UVA Parsol 1789.

10 En el documento US 4,975,272 se describe un ensayo para determinar la formación de malonaldehído usando muestras de piel que se mantuvieron en oscuridad o se expusieron a la luz solar y que se trataron con determinadas preparaciones de filtros solares.

Hanson y col. describen en "Observation and qualification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in *ex vivo* human skin", *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 76(1), 57-63, el uso de formación de imágenes de fluorescencia de dos fotones para detectar las especies de oxígeno reactivas inducidas por UV en piel humana.

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1 – muestra la extensión a la cual los antioxidantes (Aox) inhiben la formación inducida por UVR de hidroperóxidos de lípido (LOOH) *ex vivo* usando franjas de cinta para coleccionar lípidos de piel humana en presencia de tipos y niveles diferentes de Aox.

20 Figura 2 - muestra que la adición de antioxidantes a bloqueadores solares reduce significativamente formación inducida por UV de ROS dentro de la capa córnea. Con relación al control, la fórmula de bloqueador solar SPF 30 reduce el ROS por 39 % mientras que la fórmula SPF 30 con vitamina E al 0,5 % y Emblica al 0,1 % como antioxidantes reduce el ROS por 73 %. La extensión de formación ROS se codifica por color, con azul indicando niveles ROS bajos y anaranjado o rojo altos.

25 Figura 3 - muestra dos microscopios fluorescentes de fotones en las capas de la piel para demostrar la capacidad de los antioxidantes de Vitamina E y Emblica para reducir la formación inducida por UV de ROS dentro de la epidermis. Una composición que contiene Vitamina E al 0,5 % y Emblica al 0,1 % proporciona poca protección contra la formación de radical libre en la capa inferior (basal) de la epidermis.

30 Figura 4 - muestra microscopia de fluorescencia de dos fotones en las capas de la piel para demostrar el efecto de varios antioxidantes conocidos para reducir la formación inducida por UV de ROS dentro de la epidermis. Los extractos antioxidantes probados actualmente incrementan en vez de reducir los radicales libres cuando se exponen a UVR.

35 Figura 5 – muestra microscopia de fluorescencia de dos fotones en las capas de la piel para demostrar el efecto de varios antioxidantes conocidos para reducir la formación inducida por UV de ROS dentro de la epidermis después de 1 MED de UVR. Una composición que contiene Vitamina E al 0,5 % y Oxyplex ST al 0,9 % se muestran para inhibir la formación de ROS dentro de capas epidérmicas inferiores.

Figura 6 – muestra microscopia de fluorescencia de dos fotones en las capas de la piel para demostrar el efecto de varios antioxidantes conocidos para reducir la formación inducida por UV de ROS dentro de la epidermis después de 4 MED de UVR. Una composición que contiene Vitamina E al 0,5 % y Oxyplex ST al 0,9 % se muestran para inhibir la formación de ROS dentro de capas epidérmicas inferiores.

Descripción detallada

40 Un procedimiento *ex vivo* para seleccionar compuestos por su comportamiento antioxidante en una composición para aplicarse tópicamente a la piel, en el que el procedimiento de selección comprende determinar la capacidad del compuesto para inhibir la formación de tanto hidroperóxidos de lípidos en la piel inducidos por radiación ultravioleta e inhibir las especies de oxígeno reactivas inducidas por radiación ultravioleta en la epidermis;

45 en el que la determinación de la inhibición de la formación de especies de oxígeno reactivas inducidas por radiación ultravioleta en la epidermis comprende la obtención de imágenes del tejido de la piel usando obtención de imágenes de intensidad de fluorescencia de dos fotones;

50 y en el que la determinación de la inhibición de la formación de hidroperóxido de lípidos en la piel inducida por UVR comprende las etapas de aplicar en zonas distintas de la piel de un sujeto una composición que contiene antioxidantes y una composición de placebo para producir un sitio de la piel antioxidante que contiene antioxidante y lípidos de la piel y un sitio de la piel con placebo que contiene placebo y lípidos de la piel; aplicar una tira al sitio de la piel con antioxidante y al sitio de la piel con placebo para producir una muestra de la tira de antioxidante que contiene antioxidante y lípidos de la piel y una muestra de tira de placebo que contiene placebo y lípidos de la piel;

55 retirar dichas muestras de tira de la piel y exponer dichas muestras de tira de la piel a UVR para formar un producto de reacción de antioxidantes/lípidos inducida por UVR en la muestra de tira con antioxidante y un producto de reacción de placebo/lípidos inducida por UVR en la muestra de tira con placebo; poner en contacto por separado la muestra de tira con antioxidante y la muestra de tira con placebo con disolvente para preparar un primer extracto que contiene producto de reacción de antioxidantes/lípidos inducido por UVR y un segundo extracto que contiene producto de reacción de placebo/lípidos inducido por UVR; analizar dichos extractos primero u segundo para el contenido de hidroperóxido de lípidos para cada extracto; y comparar el contenido de hidroperóxido de lípidos del

primer extracto con el contenido de hidroperóxido de lípidos del segundo extracto.

En ciertas realizaciones los procedimientos de la invención comprenden las etapas adicionales de aplicar placebo a dos sitios distintos en la piel del sujeto; producir muestras de tiras de cada sitio; someter las muestras de tiras desde solo uno de los dos sitios de placebo a UVR para producir un subconjunto de muestras de tiras placebo irradiadas y un subconjunto de muestras de tiras placebo no irradiadas; poner en contacto de forma separada muestras de tiras placebo no irradiadas con el solvente para preparar un tercer extracto que contiene placebo y lípidos de piel; y evaluar el tercer extracto para contenido de hidroperóxido de lípido para determinar la formación de hidroperóxido de lípido de respaldo.

En ciertas realizaciones los procedimientos de la invención comprenden comparar el contenido de hidroperóxido de lípido del primer extracto al contenido de hidroperóxido de lípido del segundo extracto que comprende calcular el porcentaje de formación de hidroperóxido de lípido por la siguiente fórmula:

$$\%LF = \frac{(LOOH1 - LOOH3)}{(LOOH2 - LOOH3)} \times 100$$

en la que % LF es el porcentaje de formación de hidroperóxido de lípido, LOOH1 es el contenido de hidroperóxido de lípido del primer extracto, LOOH2 es el contenido de hidroperóxido de lípido del segundo extracto, y LOOH3 es el contenido de hidroperóxido de lípido del tercer extracto.

La técnica reconoce numerosos compuestos como que tienen propiedades antioxidantes. Como se usa en el presente documento, el término "antioxidante" se refiere a compuestos o combinaciones de compuestos determinados por los procedimientos de la invención para tener un %LF que es menos de 100 %. Como se usa en el presente documento el término "prooxidante" se refiere a compuestos o combinaciones de compuestos que tienen un %LF que es mayor a 100 %. Como se demuestra en el presente documento, ciertos compuestos referidos en el arte como antioxidantes actualmente tienen un comportamiento prooxidante cuando se prueban de acuerdo a los procedimientos de la invención, haciéndolos inadecuados como ingredientes en composiciones para aplicación tópica, particularmente e, bloqueadores solares, a menos que se presenten en las combinaciones como se describe en el presente documento.

Las composiciones descritas en el presente documento que contienen el Aox apropiado pueden comprender cualquier forma fácilmente conocida por aquellos de experiencia ordinaria en el arte para preparar composiciones cosméticas. Ejemplos de tales incluyen, pero no se limitan a, dispersiones en vesículas no iónicas, emulsiones, cremas, leches, geles, geles en crema, ungüentos, suspensiones, dispersiones, polvos, sólidos, barras, espumas o rocíos. En realizaciones ciertamente preferidas, la composición puede comprender un sólido o pasta, emulsión, suspensión, o dispersión anhidra o acuosa. Las formas preferibles de las composiciones incluyen una emulsión aceite en agua, una emulsión agua en aceite, una solución de alcohol, o una formulación en aerosol.

Adicionalmente, se describe una composición cosmética para aplicación tópica a la piel y/o el cabello humano, que comprende un Aox apropiado y una cantidad de Aox determinada por los procedimientos descritos en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de tales composiciones cosméticas pueden incluir productos tales como humectantes, limpiadores, acondicionadores, champú, limpiador corporal, gel/loción estilizante, crema para ojos y delineador para ojos, rubor, rimel, base (de maquillaje), barniz de uñas, removedor, sombra para ojos, lápiz labial, brillo labial, delineador labial, bálsamo labial, removedor de maquillaje, tratamiento de uñas, composiciones de cuidado de pies, tratamiento de acné, tratamiento de enrojecimiento/rosácea, tratamiento de venas varicosas/araña, composiciones anti-envejecimiento, composiciones para bronceador sin sol, composiciones para después del sol, lápices correctores, composiciones para decolorar y dar color al cabello, decolorante/abrilantadores de la piel, loción reafirmante del cuerpo, crema para afeitar, después de afeitar, relajantes, antitranspirantes y desodorantes, exfoliantes, productos para lavado por fregado, jabón de manos líquido, baño de burbujas, composiciones para el tratamiento de dolor y heridas, repelente de insectos, crema anti-comezón y salpullido, espumas y mousse estilizantes, perfumes, lubricantes, aceite corporal, rocío para cuerpo, loción para bebés, crema para pañal, jabón para bebés, champú para bebés, toallitas húmedas para bebés, tratamiento para pérdida de cabello, rocío para cabello, depilador, inhibidores del crecimiento de cabello, ceras para remover cabellos, limpiadores personales, colonias, controlador de aceite, y desinfectante para manos.

Entre los ejemplos de antioxidantes útiles en las composiciones descritas se incluyen, pero no se limitan a, malonato de dietilhexilsiringlideno, vitamina E, malonato de diisopropilvanilideno (también conocido como DIPVM) y compuestos relacionados (descritos en las patentes de EE.UU. N.º 6,602,515; 6,831,191; 6,936,735; 7,150,876; y 7,166,273), Tetrahidrocurcumenoides, zymbiozome fermentum de frijol de soja, extracto de trébol rojo, extracto de semilla de Vitis vinifera (uva)/clase B, extracto de té verde, extracto de Pikea robusta, tocoferol (y) extracto de semilla de Vitis vinifera (uva), extracto de semilla de Vitis vinifera (uva) / clase A, extracto de fruta Phyllanthus emblica y combinaciones de los mismos. Las cantidades de antioxidantes que se van a añadir a las composiciones de la invención generalmente están entre aproximadamente 0,01 % en peso hasta aproximadamente 10,0 % en peso, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 % en peso hasta aproximadamente 5,0 % en peso. Las cantidades exactas pueden determinarse por alguien de habilidad ordinaria en el arte de acuerdo a procedimientos

probados descritos en el presente documento.

Adicionalmente, la composición descrita en el presente documento puede comprender Vitamina E solo como un antioxidante en una cantidad mayor que aproximadamente 0,05 % en peso, en una cantidad de aproximadamente 0,1 % en peso o mayor, en una cantidad de aproximadamente 0,25 % en peso o mayor, y en una cantidad de aproximadamente 0,5 % en peso o mayor.

Asimismo, la composición puede comprender Vitamina E como un antioxidante y al menos un compuesto antioxidante adicional.

Además, la composición descrita en el presente documento puede comprender Vitamina E en combinación con un compuesto pro-oxidante como se determina por los procedimientos de la invención, donde la presencia de Vitamina E en estas realizaciones contrarrestará los efectos pro-oxidantes de estos compuestos para formar una combinación antioxidante. En ciertas realizaciones de esta composición la Vitamina E está presente en una cantidad mayor que aproximadamente 0,05 % en peso, en una cantidad de aproximadamente 0,1 % en peso o mayor, en una cantidad de aproximadamente 0,25 % en peso o mayor, y en una cantidad de aproximadamente 0,5 % en peso o mayor. Los ejemplos de tales compuestos pro-oxidantes que serán útiles en las composiciones de la invención que comprenden Vitamina E incluyen, pero no se limitan a, Oleoresina de romero officinalis, Extracto de Rosa Gallica, Complejo fotosintético bioactivo de plantas verdes, Fermentado de *Thermus Thermophilus*, ergotiotaina y combinaciones de los mismos. Las cantidades de pro-oxidantes a agregarse a las composiciones de la invención generalmente están entre aproximadamente 0,01 % en peso hasta aproximadamente 10,0 % en peso, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 % en peso hasta aproximadamente 5,0 % en peso. Las cantidades exactas pueden determinarse por alguien de habilidad ordinaria en el arte de acuerdo a procedimientos probados descritos en el presente documento.

Adicionalmente, la composición descrita en el presente documento puede estar en la forma de un aerosol, en el que la composición se combina con al menos un propelente, que puede ser cualquier gas apropiado que puede comprimirse o licuarse dentro de un bote que dispensa rocío y que se expande o volatiza hasta vapor o gas formado durante la exposición a temperatura ambiente y condiciones de presión para liberar la composición en una forma en aerosol. Los propelentes apropiados incluyen hidrocarburos que tiene 1 hasta 5 átomos de carbono, incluyendo pero no limitado a metano, etano, propano, isopropano, butano, isobutano, buteno, pentano, isopentano, neopentano, penteno, hidrofluorocarbonos (HFC, por sus siglas en inglés), clorofluorocarbonos (CFC, por sus siglas en inglés), nitrógeno, éteres incluyendo dimetil éter, y cualquier mezcla de los mismos. Los expertos en la materia reconocen que en un recipiente cerrado tal como un bote de aluminio, los propelentes tales como dimetil éter condensan hasta el estado líquido a temperatura ambiente. De esta manera, la composición en el recipiente de aerosol es una formulación líquida que puede contener un propelente disuelto, propelente líquido no disuelto y propelente gaseoso. Todo esto está bajo presión debido a la presión de vapor del propelente. En la práctica de la invención actual, el propelente puede presentarse en una cantidad de hasta aproximadamente 90 por ciento en peso, preferiblemente desde aproximadamente 2 por ciento en peso hasta aproximadamente 50 por ciento en peso, y más preferiblemente aproximadamente 5 por ciento en peso hasta aproximadamente 40 por ciento en peso, aún más preferiblemente 30 por ciento en peso, con base en el peso total de la composición en aerosol.

Las composiciones también pueden comprender espumas en aerosol o las llamadas composiciones de mousse. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 6,627,585 describe una composición de champú limpiador que forma mousse que comprende un concentrado que forma espuma que comprende al menos un tensioactivo, partículas dispersadas de un agente acondicionador insoluble en agua, un portador acuoso; y un propelente en aerosol. La patente de EE.UU. n.º 6,264,964 describe una composición cosmética que incluye un elastómero de polisiloxano no emulsionable reticulado y un polímero de carboxivinilo que está en la forma de una espuma en aerosol en un sistema presurizado. El propelente puede introducirse en la composición en mousse al momento del llenado al usar un dispensador de aerosol estándar, por ejemplo, una configuración de bote de rocío.

La invención sujeto contempla la incorporación de Aox con filtro solar activo en productos de filtro solar y pantalla solar y cualquier otra composición tópicamente aplicada donde la adición de agentes activos de bloqueador solar y/o Aox no restan eficacia al producto ni afectan la capacidad de filtro solar de los agentes activos de filtro solar.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden contener un amplio intervalo de componentes opcionales, adicionales, que se refieren en el presente documento como "componentes cosméticos", pero que también pueden incluir componentes generalmente conocidos como agentes farmacéuticamente activos. El CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Séptima Edición, 1997 y la Octava Edición, 2000, que se incorpora para referencia en el presente documento en su totalidad, describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos comúnmente usados en composiciones de cuidado de la piel, que son apropiadas para uso en la composición de la presente invención. Los ejemplos de estas clases funcionales descrita en esta referencia incluyen: absorbentes, abrasivos, agentes antigrumos, agentes antiespumantes, antioxidantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes amortiguadores, agentes de volumen, agentes quelantes, aditivos químicos, colorantes, astringentes cosméticos, biocidas cosméticos, desnaturalizantes, astringentes fármacos, analgésicos externos, formadores de película, componentes de fragancia, humectantes, agentes opacificantes, ajustadores del pH, plastificadores, agentes de reducción, agentes blanqueadores de la piel, agentes acondicionadores de la piel (emolientes, humectantes,

misceláneos y oclusivos), protectores de la piel, solventes, potenciadores de espuma, hidrotropos, agentes solubilizantes, agentes de suspensión (no tensioactivos) agentes bloqueadores solares, absorbentes de luz ultravioleta, potenciadores del SPF, agentes a prueba de agua, y agentes que incrementan la viscosidad (acuosa y no acuosa).

5 En la práctica de la invención, la composición puede contener uno o más agentes activos de filtro solar. Para propósitos de la presente invención, a "agente activo de filtro solar" o "activo de filtro solar" deberán incluir todos aquellos materiales, en forma sencilla o en combinación, que se aprecian como aceptable para uso como ingredientes de filtro solar activo con base en su capacidad para absorber la radiación UV. Tales compuestos se describen generalmente como que son agentes activos UV-A, UV-B, o UV-A/UV-B. La aprobación por la agencia reguladora se requiere generalmente para inclusión de agentes activos en formulaciones pretendidas para uso humano. Aquellos agentes activos que están o se han aprobado actualmente para uso como bloqueador solar en los Estados Unidos de América incluyen sustancias orgánicas e inorgánicas que incluyen, sin limitación, ácido para aminobenzoico, avobenzona, cinoxato, dioxibenzona, homosalato, metil antranilato, octil salicilato, oxibenzona, padimato O, ácido fenilbenzimidazol sulfónico, sulisobenzona, salicilato de trolamina, dióxido de titanio, ácido de zinc, metoxicinnamato de dietanolamina, trioleato de digalloy, etil dihidroxipropil PABA, aminobenzoato de glicerilo, lawsona con dihidroxiacetona, petrolato rojo. Los ejemplos de activos de filtro solar adicionales que aún no se han aprobado por los E.U.A pero se permiten en formulaciones vendidas fuera de los E.U.A incluyen etilhexil triazon, dioctil butamido triazon, benziliden malonate polisiloxano, ácido tereftaliliden dicanfor sulfónico, tetrasulfonato de disodio fenil dibenzimidazol, dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato, bis dietilamino hidroxibenzoil benzoato, bis benzoxazoilfenil etilhexilimino triazina, drometrizol trisiloxano, metilen bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol, y bis-etilhexiloxifenol metoxifeniltriiazina, 4-metilbencilidencanfor, e isopentil 4-metoxicinnamato. Sin embargo, como la lista de bloqueadores solares aprobados se expande actualmente, aquellos de experiencia ordinaria reconocerán que la invención no se limita a agentes activo de filtro solar actualmente aprobadas para uso humano pero se aplica fácilmente a aquellos que pueden permitirse en el futuro. Un agente activo de filtro solar adicional comprende una cantidad efectiva fotoprotectora de partículas de al menos un pigmento o nanopigmento inorgánico, los ejemplos no limitantes de los cuales incluyen dióxido de titanio, óxido de zinc, óxido de hierro, óxido de circonio, óxido de cerio, o mezclas de los mismos.

Las composiciones descritas en el presente documento también pueden incluir materiales que también incrementan el SPF de la composición final por tales mecanismos esparcido y dispersión de radiación UV. Tales materiales se refieren en el presente documento como "Agentes de esparcido de radiación UV" y comprende materiales que exhiben actividad que absorbe UV o no exhibe actividad que absorbe UV. Un ejemplo de tales agentes de esparcido de radiación UB incluyen materiales poliméricos, tales como el producto conocido como SunSpheres™ (Rohm y Haas; Filadelfia, PA) que se describe por su fabricante como esferas de copolímero de estireno/acrilatos huecas fabricadas por polimerización por emulsión. Las esferas de polímero se dice que elevan los valores de SPF a través de la región UVA y UVB al dispersar y/o esparcir la radiación UV incidental a través de la película del bloqueador solar presente en la superficie, tal como piel humana. Se entiende que las esferas provocan que menos radiación UV penetre en la piel al redireccionar la radiación hacia el bloqueador solar que absorbe UV activo en la formulación de bloqueador solar, donde la radiación reacciona con las moléculas activas de bloqueador solar y la energía se disipa como calor. Como se usa en el presente documento, los términos "esferas" o "agentes de esparcido" no se limitan por forma o fabricación química, pero comprenden cualquier agente que produce el efecto de alargar la trayectoria de la radiación UV incidental, incrementando la probabilidad estadística de que la radiación contacte una molécula activa de bloqueador solar, esto es, un agente activo que absorbe UV. Estos materiales también pueden incluir materiales absorbentes de UV que también exhiben propiedades de esparcido tales como ZnO (los ejemplos incluyen productos Z-Cote™ disponibles de BASF), TiO₂ (los ejemplos incluyen los productos Solaveil™ disponibles de Uniqema (New Castle, DE, EE.UU.)), compuestos tales como bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol metileno, ("Tinasorb™ M" disponible de Ciba Specialty Chemicals, Inc. (Basall, Suiza)). Los agentes de esparcido de radiación UV se presentan típicamente en la formulación en cantidades de hasta aproximadamente 10 % en peso, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 7,0 % en peso, en intervalos particularmente preferidos de 3 % hasta aproximadamente 5 % en peso.

50 Como se usa en el presente documento, los términos "agente de bronceado sin sol" o "composiciones de auto-bronceado" se refieren a composiciones que, cuando se aplican a la piel humana, imparten a esta una apariencia similar a la que se alcanza al exponer la piel a luz solar natural o artificial. Los ejemplos de agentes activos de bronceado sin sol son descritos en las Patentes de EE.UU. N.º 6,482,397, 6,261,541, y 6,231,837, Tales composiciones de bronceado sin sol comprenden típicamente, además de una cantidad efectiva de bronceado artificial de un agente de autobronceado, efectiva las cantidades de una composición agente colorante y un portador cosméticamente aceptable adaptado para aplicación tópica a la piel humana. Los agentes de auto bronceado pueden incluir también aquellas composiciones generalmente aceptadas en el arte para aplicación a la piel humana, y que, cuando se aplican de esta manera, reaccionan en esta con aminoácidos de manera que forman productos pigmentados. Tales reacciones dan a la piel una apariencia café similar al color obtenido durante la exposición a la luz solar por periodos de tiempo suficientes para broncear la piel. Los agentes de auto bronceado incluyen, sin limitación, aldehídos y cetonas alfa-hidroxi, gliceraldehído y aldehídos de alcohol relacionados, varios indoles, imidazoles y derivados de los mismos, y varios agentes de pigmentación aprobados. Los agentes de auto-bronceado actualmente preferidos en el presente documento son aldehídos y cetonas alfa-hidroxi. Aún más preferiblemente, el

agente de auto bronceado es dihidroxiacetona ("DHA"). Otros agentes de auto bronceado incluyen, sin limitación, metil glioxal, glicerol aldehído, eritrosa, aloxan, 2,3-dihidroxisuccindialdehído, 2,3-dimetoxisuccindialdehído, 2-amino-3-hidroxi-succindialdehído y 2-bencilamino-3-hidroxisuccindialdehído.

5 Los emulsionantes o tensioactivos apropiados incluyen tensioactivos aniónicos y catiónicos, no tóxicos, no iónicos, farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos apropiados incluyen ésteres de ácido graso de glicerol tales como monoestearato de glicerol, ésteres de ácido graso de glicol tales como monoestearato de propilenglicol, ésteres de ácido graso de alcohol polihídrico tales como monooleato de polietil glicol (400), ésteres de ácido graso de polioxietileno tales como estearato de polioxietileno (40), éteres de alcohol graso de polioxietileno tales como éter de polioxietileno estearilo (20), ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitan tales como monoestearato de polioxietileno sorbitan, ésteres de sorbitan tales como monoestearato de sorbitan, alquil glicósidos tales como cetearil glicósido, enanolamidas de ácido graso y sus derivados tales como la dietanolamida de ácido esteárico, y similares. Los ejemplos de tensioactivos aniónicos apropiados son jabones incluyendo jabones alcalinos, tales como sales de sodio, potasio y amonio de ácidos carboxílicos alifáticos, usualmente ácidos grasos, tales como estearato de sodio. Los jabones de amina orgánicos incluyen sales de amina orgánicas de ácidos carboxílicos alifáticos, usualmente ácidos grasos, tales como estearato de trietanolamina. Los jabones metálicos incluyen sales de metales polivalentes y ácidos carboxílicos alifáticos, usualmente ácidos grasos, tales como estearato de aluminio. Otras clases de tensioactivos aniónicos apropiados incluyen alcoholes de ácido graso sulfatados tales como lauril sulfato de sodio, aceites sulfatados tales como el éster sulfúrico de sal de disodio de ácido ricinoleico, y compuestos sulfonados tales como sulfonatos de alquilo que incluyen sulfonato de sodio cetano, sulfonatos de amida tales como N-metil-N-oleil laurato de sodio, ésteres de ácido dibásico sulfonados tales como dioctilo sulfosuccinato de sodio, alquil aril sulfonatos tales como dodecilbenceno sulfonato de sodio, alquil naftalen sulfonatos tales como isopropilo naftalen sulfonato de sodio, sulfonato de petróleo tales como aril naftaleno con substitutos de alquilo. Los ejemplos de tensioactivos catiónicos apropiados incluyen sales de amina tales como cloruro de octadecil amonio, compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio

25 Un emoliente es una sustancia oleaginosa o aceitosa que ayuda a alisar y suavizar la piel, y puede también reducir su aspereza, propiedad quebradiza o irritación. Los emolientes apropiados típicos incluyen aceite mineral que tiene una viscosidad en el intervalo de 50 hasta 500 centipoises (cps), aceite de lanolina, aceite de coco, manteca de cacao, aceite de olivo, aceite de almendra, aceite de nuez de macadamia, extracto de sábila tal como lipoquinona de sábila (aloe vera), aceites de jojoba sintética, aceites de jojoba sonora natural, aceite de girasol, aceite de maíz, lanolina líquida, aceite de semilla de algodón, y aceite de cacahuate. Preferiblemente, el emoliente es un cocoglicérido, que es una mezcla de mono, di y triglicéridos de aceite de cacao, vendida bajo el nombre comercial de Myritol 331 de Henkel KGaA, o éter de dicaprolilo disponible bajo el nombre comercial Cetiol OE de Henkel KGaA o un alquil benzoato C₁₂-C₁₅ vendido bajo el nombre comercial Finsolv TN de Finetex. Uno o más emolientes pueden estar presentes en el intervalo en cantidades desde aproximadamente 1 por ciento hasta aproximadamente 10 por

30 ciento en peso, preferiblemente aproximadamente 5 por ciento en peso. Otro emoliente apropiado es DC 200 Fluid 350, un fluido de silicona, disponible de Dow Corning Corp.

Otros emolientes apropiados incluyen escualeno, aceite de ricino, polibuteno, aceite de almendra dulce, aceite de aguacate, aceite de calofilo, aceite de ricina, acetato de vitamina E, aceite de olivo, aceite de silicona tal como dimetilopolisiloxano y ciclometicona, alcohol linolénico, alcohol de oleilo, el aceite de germinados de cereal tales como el aceite de germen de trigo, palmitato de isopropilo, pamitato de octilo, miristato de isopropilo, estearato de hexadecilo, estearato de butilo, oleato de decilo, glicéridos de acetilo, los octanoato y benzoatos de alcoholes (C₁₂ - C₁₅), los octanoatos y decanoatos de alcoholes y polialcoholes tales como aquellos de glicol y glicerilo, ésteres de ricinoleatos tales como isopropilo adipato, laurato de hexilo y dodecanoato de octilo, maleato de dicaprolilo, aceite vegetal hidrogenado, feniltrimeticona, aceite de jojoba y extracto de sábila.

45 Pueden usarse otros emolientes apropiados que son sólidos o semisólidos a temperaturas ambiente. Tales emolientes cosméticos sólidos o semisólidos incluyen gliceril dilaurato, lanolina hidrogenada, lanolina hidroxilada, lanolina acetilada, petrolato, isopropilo lanolato, miristato de butilo, miristato de cetilo, miristato de miristilo, lactato de miristilo, alcohol cetílico, alcohol isistearílico e lanolato de isocetilo. Pueden incluirse uno o más emolientes opcionalmente en la formulación.

50 Un humectante es un agente que humedece que promueve la retención de agua debido a sus propiedades higroscópicas. Los humectantes apropiados incluyen glicerina, glicoles poliméricos tales como polietil glicol y polipropileno glicol, manitol y sorbitol. Preferiblemente, el humectante es Sorbitol, 70 % USP o polietil glicol 400, NF. Pueden incluirse uno o más humectantes opcionalmente en la formulación en cantidades desde aproximadamente 1 por ciento hasta aproximadamente 10 por ciento en peso, preferiblemente aproximadamente 5

55 por ciento en peso.

Un modificador de la sensación de sequedad es un agente que cuando se agrega a la emulsión, imparte una "sensación de sequedad" a la piel cuando se seca la emulsión. Los modificadores de sensación de secado pueden incluir talco, caolín, caliza, óxido de zinc, fluidos de silicona, sales inorgánicas tales como sulfato de bario, superficie tratada con sílice, sílice precipitado, sílice fumado tal como un Aerosil disponible de Degussa Inc. de New York, N.Y. E.U.A. Otro modificador de la sensación de sequedad es un almodón de glicerilo reticulado de epoclorohidrina del tipo que se describe en la Patente de EE.UU. n.º 6,488,916.

60

Puede ser ventajoso incorporar agentes espesantes adicionales, tales como, por ejemplo, varios Carbopoles disponibles de Noveon Co. Los agentes particularmente preferidos son aquellos que no podrían romper la estructura lamelar en la formulación del producto final, tal como agentes espesantes no iónicos. La selección de agentes espesantes adicionales está bien dentro de la experiencia de alguien en el arte.

- 5 También pueden agregarse sustancias naturales o sintéticas adicionales a las composiciones de la invención para protegerlas de o retardar su deterioro debido a la acción del oxígeno en el aire (oxidación). También pueden reducirse las reacciones de oxidación en el tejido de la piel. Tales sustancias previenen el deterioro oxidante que puede llevar a la generación rancidez y productos de reacción de tono café no enzimáticos. Las sustancias apropiadas típicas incluyen ésteres de propil, octil y dodecil de ácido gálico, hidroxianisol butilado (BHA, usualmente adquiridos como una mezcla de isómeros orto y meta), hidroxitolueno butilado (BHT), extracto de té verde, ácido úrico, cisteína, piruvato, ácido nordihidrogiaiarético, Vitamina A, Vitamina E y Vitamina C y sus derivados. Pueden incluirse opcionalmente una o más sustancias en la composición en una cantidad en el intervalo desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 5 por ciento en peso, preferiblemente aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 0,5 por ciento.
- 10
- 15 Los agentes quelantes son sustancias usadas para quelar o mezclar iones metálicos, tal como con una estructura de anillo heterocíclica de manera que el ion se mantiene por enlaces químicos de cada uno de los anillos participantes. Los agentes quelantes apropiados incluyen ácido etilen diaminatetraacético (EDTA), disodio de EDTA, edeato disodio de calcio, trisodio de EDTA, albúmina, transferrina, desferoxamina, desferal, mesilato de desferoxamina, tetrasodio de EDTA y dipotasio de EDTA, o combinaciones de cualesquiera de estos.
- 20 Las fragancias son sustancias aromáticas que pueden impartir un aroma estéticamente agradable a la composición de bloqueador solar. Las fragancias típicas incluyen materiales aromáticos extraídos de fuentes botánicas (esto es, pétalos de rosas, flores de gardenia, flores de jazmín, etc.) que pueden usarse solas o en cualquier combinación para crear aceites esenciales. Alternativamente, los extractos alcohólicos pueden prepararse para componer fragancias. Sin embargo, debido a los costos relativamente altos de las fragancias obtenidas de sustancias naturales, la tendencia moderna es usar fragancias preparadas sintéticamente, particularmente en productos de alto volumen. Una o más fragancias pueden incluirse opcionalmente en la composición de filtro solar en una cantidad en el intervalo desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 5 por ciento en peso, preferiblemente aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 0,5 por ciento en peso. Los conservadores adicionales también pueden usarse si se desea e incluyen composiciones conservadoras bien conocidas tales como alcohol bencílico, alcohol fenil etílico y ácido benzoico, diazolidinil, urea, clorfenesina, yodopropinil y butil carbamato, entre otros
- 25
- 30

Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender además agentes activos protectores de la piel. Los ejemplos apropiados incluyen (con intervalos de porcentaje en peso preferidos), Alantoina (0,5 hasta 2 por ciento); gel de hidróxido de aluminio (0,15 hasta 5 por ciento); Calamina (1 hasta 25 por ciento); manteca da cacao (más de 50); Aceite de hígado de bacalao (5 hasta 14 por ciento); avena coloidal; Dimeticona (1 hasta 30 por ciento); Glicerina (20 hasta 45 por ciento); manteca dura (más de 50); caolín (4 hasta 20 por ciento); Lanolina (12,5 hasta 50 por ciento); aceite mineral (más de 50 por ciento); Petrolato (más de 30 por ciento); bicarbonato de sodio; almidón tóxico (10 hasta 98 por ciento); petrolato blanco (más de 30 por ciento); acetato de zinc (0,1 hasta 2 por ciento); carbonato de zinc (0,2 hasta 2 por ciento); y Óxido de zinc (1 hasta 25 por ciento).

35

- Las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir además componentes repelentes de insectos. El agente activo representante de insectos más ampliamente usado para productos de cuidado personal es N,N-Dietil-m-toluamida, frecuentemente llamado "DEET" y disponible en la forma de un concentrado que contiene al menos aproximadamente 95 por ciento DEET. Otros repelentes químicos sintéticos incluyen butilacetilaminopropionato de etilo (también conocido como IR 3535), dimetil ftalato, etil hexanediol, indalona, di-n-propilisocinoronato, biciclohepteno, dicarboximida y tetrahidrofuraldehído. Ciertos materiales derivados de plantas también tienen actividad repelente de insectos, incluyendo aceite de citroneta y otras fuentes de citroneta (incluyendo aceite de hierba de limón), limoneno, aceite de romero y aceite de eucalipto. La elección de un repelente de insectos para la incorporación en la emulsión de filtro solar frecuentemente se influenciará por el olor del repelente. La cantidad de agente repelente usada dependerá de la elección del agente; el DEET es útil a concentraciones altas, tal como hasta aproximadamente 15 por ciento o más, mientras que algunas sustancias derivadas de plantas se usan típicamente en cantidades mucho menores, tales como 0,1 por ciento o menos.
- 40
- 45
- 50

- La aplicación tópica de las composiciones descritas en el presente documento para el cabello o piel de un humano proporcionará protección aumentada contra efectos nocivos de radiación ultravioleta (UVR). Así, la invención actual además proporciona un procedimiento para proteger la piel y/o cabello humano contra los efectos nocivos de radiación solar, más particularmente UVR, cuyo procedimiento comprende aplicar tópicamente a este una cantidad efectiva de las composiciones como se describe en el presente documento que contiene bloqueadores solares y uno o más antioxidantes. Un resultado estéticamente benéfico de exposición de la piel a UVR (esto es, longitudes de radiación de luz desde 280 nm hasta 400 nm) es la promoción de bronceado de la epidermis humana. Otro beneficio de la exposición al sol proviene de la producción de Vitamina D dentro de la piel. Los UVR se dividen típicamente en regiones UV-A (longitudes de onda de luz desde 320 hasta 400 nm) y UV-B (longitudes de onda en el intervalo desde 280 hasta 320 nm). La sobreexposición a irradiación UV-B se entiende generalmente como que lleva a quemaduras de la piel y eritema. Además, la sobreexposición a radiación UV-A puede causar una pérdida de
- 55
- 60

elasticidad de la piel y la aparición de arrugas, promoviendo el envejecimiento prematuro de la piel. Tal irradiación promueve la activación de la reacción eritemal o amplifica esta reacción en ciertos individuos y puede incluso ser la fuente de reacciones fototóxicas o fotoalérgicas. Se cree cada vez más que la sobreexposición a UV-A puede llevar también a melanoma. Así, la aplicación de las composiciones de la invención a la piel y/o cabello de un individuo proporcionará una fotoprotección de UVR aumentada (UV-A y/o UV-B) de la piel y/o cabello del individuo.

La invención además proporciona un procedimiento para tratar y/o revertir el fotodaño de la piel al aplicar las composiciones de la invención a la piel que se expondrá o ha expuesto a UVR. El término "tratar y/o revertir el fotodaño" se pretende que signifique obtener una mejora en uno o más atributos de el estado de la piel tal como sequedad, textura, elasticidad/firmeza/resiliencia, líneas/arrugas, tono de piel/claridad, uniformidad de pigmentación, y/o eritema cuyo estado se ve agravado por la exposición a UVR.

Las composiciones de la invención que contienen el filtro solar se pretenden que proporcionen un factor de protección solar (SPF) en la puntuación de al menos 2, con realizaciones adicionales preferidas que tienen un factor de protección solar de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, y al menos 100, Las composiciones de la invención que contienen el bloqueador solar se pretenden también que proporcionen "puntuaciones de estrella" U.S. FDA UV-B de al menos una estrella, al menos dos estrellas, al menos tres estrellas y hasta cuatro estrellas.

La invención se describirá además por medio de los siguientes ejemplos, los cuales no se pretende que limiten la invención, como se define por las reivindicaciones adjuntas, de ninguna manera.

Sección experimental

Prueba de radicales libres DPPH (α,α -difeníl- β -picrilhidrazil).

El DPPH es un radical libre estable que cuando se disuelve en solución forma un color morado intenso. Cuando se reduce por un antioxidante, el color morado se desvanece hasta que finalmente desaparece cuando el DPPH se reduce completamente. La extensión a la cual el color se desvanece se puede fácilmente medir y usar para clasificar la efectividad relativa de materiales diferentes propuestos para tener propiedades antioxidantes.

Las mediciones se registraron para materiales puros antioxidantes en solución de metanol sencilla. Las muestras se prepararon al disolver antioxidantes en diversas concentraciones en metanol. Después de preparación de muestra, 125 μ l de la muestra o metanol puro como un control se pipetearon en tubos de prueba de muestra seguido por 2 ml de metanol y se coloca en vórtice. Luego 2 ml de solución de reserva DPPH (0,25 mM en metanol) se agregó a cada tubo (dando un volumen total de 4,125 ml para cada muestra) y se coloca en vórtice. Inmediatamente después de la adición de DPPH, los tubos de prueba se cubrieron y colocaron en un baño de agua a 30°C durante 20 minutos. Después de 20 minutos de incubación, la absorbancia de cada muestra se registró a 517 nm usando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40, Todas las muestras se prepararon por triplicado y sus valores de absorbancia media se usaron para expresar la eficacia de antioxidantes en diversas concentraciones en términos de unidades de reducción de antioxidante (ARU) al usar la siguiente ecuación:

$$ARU = (\text{Control de Absorbancia de Metanol} - \text{muestra de Absorbancia}) \times 10$$

Intervalo de valores ARU en magnitud a partir de 0 para "no" eficacia hasta aproximadamente 15 para materiales puros que tienen alta eficacia antioxidante.

La efectividad de antioxidante para una variedad de materiales puros solubles en agua y aceite propone tener las propiedades antioxidantes que aparecen en la Tabla 1, Los materiales puros incluyen antioxidantes bien conocidos tales como Vitamina E, además de extractos de planta populares tales como te verde, rosa, uva y hongos, entre otros. La eficacia se expresa como unidades de reducción antioxidante (ARU), cuyos valores abarcan de 0 para antioxidantes sin eficacia hasta 12 con alta eficacia para reducir el radical DPPH. Los ejemplos de antioxidantes solubles tanto en aceite como agua abarcan este intervalo.

TABLA 1

Antioxidante	Nivel (%)	ARU	Solubilidad
Oleoresina de romero officinalis [ROO] *	0,1	0,0	O
Ácido arjunólico (1 %)	1,0	0,4	O
Malonato de siringilideno de dietilhexilo	1,0	5,7	O
Vitamina E [Vit. E] *	0,5	6,5	O
Tetrahidrocurcumenoides [THC]*	0,5	9,0	O
Complejo fotosintético bioactivo de plantas verdes [BPSC]*	0,1	0,0	W

(continuación)

Antioxidante	Nivel (%)	ARU	Solubilidad
Fermentación de <i>Thermus thermophilus</i> [Thermus]*	1,0	0,0	W
Ergotiotaina [ET]*	0,1	0,0	W
Extracto de <i>Rosa gallica</i> [Rosa G]*	1,0	0,0	W
Extracto de semilla de hinojo (fennel)	5,0	0,0	W
zymbiozome fermentum de frijol de soya	1,0	0,0	W
Extracto del hongo Shitake	5,0	0,0	W
Extracto de <i>helianthus annuus</i> (girasol)	1,0	0,0	W
Extracto de trébol rojo	1,0	0,6	W
Extracto de semilla <i>vitis vinifera</i> (uva) / tipo B	0,1	1,9	W
Extracto de té verde [GT]*	0,1	2,2	W
Extracto de <i>pikea robusta</i>	1,0	2,2	W
Extracto de semilla de <i>vitis vinifera</i> (uva) (y) Tocoferol	1,0	7,6	W
Cisteína n-Aceto [NAC] *	0,1	9,9	W
Extracto de semilla de <i>vitis vinifera</i> (uva) / tipo A	0,1	11,5	W
Extracto de fruta de grosella de la India [Emblica]*	0,1	11,5	W

5 En comparación con la vitamina E, algunos materiales claramente poseen efectividad antioxidante más baja (ARU < 6,5) mientras que otros poseen más alta (ARU > 6,5). Con base solo en los valores ARU, deberá esperarse que los antioxidantes con ARU > 6,5 deberán ser superiores a la vitamina E en su capacidad para neutralizar la formación inducida por UVR de ROS dentro de la piel. Sin embargo, se reconoce que ROS cubre un amplio intervalo de compuestos reactivos, incluyendo radicales libres pero también otros oxidantes tipo peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete o peroxinitrito, que resultan de la prueba radical libre de DPPH pueden no predecir adecuadamente la efectividad antioxidante en la piel que se expone a UVR. Por lo tanto, los diversos antioxidantes seleccionados (denotados con *) de la Tabla 1 cubren un intervalo de valores ARU para probar en sistemas modelo que imitan más cercanamente la piel humana intacta expuesta a UVR para entender si la efectividad Aox en solución como se mide por la prueba radical libre de DPPH se traduce a los niveles similares de efectividad en la piel.

Procedimiento de franjas de cinta *ex vivo* para evaluar la capacidad de los antioxidantes para inhibir la peroxidación de lípidos.

15 Para determinar si los antioxidantes (Aox) mantienen su efectividad en la piel en presencia de UVR, se inventó un modelo novedoso y más relevante que utiliza lípidos de piel humana como sustratos para la peroxidación inducida por UVR. Los lípidos removidos de la piel en las piezas amplias de la cinta sirven como los sustratos para exposición posterior a UVR. Al aplicar una loción estándar con o sin Aox a la piel antes de formar franjas de cinta, pueden recolectarse lípidos de piel en franjas de cinta en presencia o ausencia de Aox que esencialmente mantiene la misma proximidad que los lípidos y Aox que tiene en la piel. Después de la exposición a UVR, la extensión para la cual la presencia de lípidos protectores Aox contra la peroxidación de ROS puede medirse con relación a los lípidos en ausencia de antioxidantes.

25 Los voluntarios humanos se reclutaron para las pruebas y se les preguntó si no aplicaron ningún producto a sus brazos durante al menos dos días antes de la prueba. Antes de cualesquiera tratamientos del producto, los aspectos internos de los antebrazos derecho e izquierdo de los sujetos se limpiaron con un Kimwipe™ humedecido con isopropanol para remover cualesquiera residuos que podrían estar en la superficie de la piel. Los brazos se limpiaron solamente una vez aplicando presión suave y luego se permitieron secar al menos 10 minutos antes de continuar. Una plantilla (90 mm x 50 mm) se posicionó en cada antebrazo interior de tal manera que dos áreas pueden delinearse claramente. Usando una pluma Sharpie™ tipo superfino, una marca se colocó a cada rincón de la plantilla para perfilar cada sitio de aplicación, con dos sitios delimitados por antebrazo. Usando un dedal, cualquier loción de placebo o antioxidante se aplicó (100 mg) a un sitio delimitado en un antebrazo. Se tomó cuidado para asegurar que los productos se aplicaron eventualmente dentro del área de aplicación entera. Después de la aplicación, se permitieron secar con aire los sitios por 30 minutos durante los cuales a los sujetos se les ordenó no permitir que ninguna ropa estuviera en contacto con las áreas de prueba.

35 Después las lociones se secaron durante 30 minutos, cada sitio se formó en franjas de cinta usando una pieza de 4,0 pulgadas (10,16 cm) de cinta de etiqueta de prescripción No. 800 marca Scotch® (1,5 pulgadas de ancho (3,81 cm)). Un extremo de la cinta se dobló para proporcionar un borde que no se adhiere a la piel para fácil remoción. La

pieza de cinta se posicionó sobre un sitio y luego usando un dedo la cinta se presionó suavemente en la piel para hacer buen contacto. Luego la cinta se removió rápidamente del brazo de los sujetos. Después de la remoción, todas las cintas se almacenaron en un ubicación oscura tal como un cajón hasta que ya sea se irradiaron con UV o se extrajeron con isopropanol (esto es, control no irradiado). Las franjas de cinta seleccionadas de la piel de cada sujeto se irradiaron con una dosis de 10 joules/cm² usando un simulador solar 1000 W Xe arc (WG320 filtrado). Un espectroradiómetro Optronics OL-754 se usó para ajustar la salida del simulador solar para administrar una dosis constante de UVR. Después de la irradiación, las cintas se recortaron a una longitud de tres pulgadas (7,62 cm) y colocaron en viales de centelleo de vidrio de 20 ml. Luego cuatro ml de isopropanol se agregó a cada vial, después los cuales se taparon. Los viales luego se agitaron vigorosamente de nuevo y se colocaron en un congelador -20°C para extraerse durante la noche. Al día siguiente las muestras se agitaron antes las alícuotas se removieron para análisis de hidroperóxido de lípido (LOOH).

Cada extracto de cinta se procesó por ensayo para contenido LOOH total usando un Kit de Ensayo de Hidroperóxido de Lípido (Kamiya Biomedical Company, Thousand Oaks, CA) siguiendo las direcciones del fabricante. Los hidroperóxidos de lípido luego se cuantificaron al medir la formación de azul de metileno en 675 nm usando un espectrofotómetro. Las curvas estándar se prepararon usando hidroperóxido de cumeno y se alinearon sobre el intervalo de LOOH detectado en estos experimentos. Cada extracto se proceso por ensayo en triplicado y los resultados presentados aquí representan la media de aquellos análisis. Las desviaciones estándar fueron típicamente menos del 10 %.

La extensión para la cual las lociones de antioxidante (Aox) o placebo inhiben la formación de hidroperóxido de lípido (LOOH) inducido por UVR se calculó al insertar los valores de LOOH determinado de los cuatro sitios de aplicación en cada voluntario dentro de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de formación de LOOH} = \frac{(\text{LOOH Aox irradiado} - \text{LOOH placebo no irradiado})}{(\text{LOOH placebo irradiado} - \text{LOOH placebo no irradiado})} \times 100$$

El cálculo del “ % de formación de LOOH” permite que cada sujeto tenga su propio control interno y normaliza los datos con respecto al área de la cinta (3 pulgadas (7,62 cm)) usado para la piel en franjas. De esta forma, los valores para el % de formación de LOOH pueden compararse entre los sitios en diferentes personas.

Los datos se analizaron usando pruebas t en pares para determinar si los tratamientos de antioxidante o placebo proporcionan resultados de manera importante diferentes. Un nivel alfa de .05 y un poder de 80 % se usó para todas las pruebas estadísticas.

Los resultados para los antioxidantes seleccionados (* en la Tabla 1) para proteger los lípidos de formación ROS inducida por UVR aparecen en la Figura 1, la cual revela diversas fracturas sorprendente. Tanto los materiales solubles en agua como en aceite pueden proteger los lípidos contra la peroxidación inducida por UVR; sin embargo, el material crudo deber ser capaz de dividirse en las bicapas de lípido para protegerse. La vitamina E protege los lípidos de piel en una manera dependiente de dosis (barras amarillas). Los tetrahidrocurcuminoides (THC) son eficaces como la Vitamina E. La vitamina E en combinación con Emblica, GT o THC (barras anaranjadas) protegen alrededor así como a la Vit. E sola (barras amarillas). De manera sorprendente, algunos materiales (barras rojas) incrementan más que los niveles de hidroperóxido de lípido disminuidos (LOOH), actúan como pro-oxidantes como opuestos a antioxidantes. La adición de la vitamina E puede reducir las propiedades pro-oxidantes (carras azules) de antioxidantes pero no al mismo grado como se observa con la vitamina E sola.

Estos resultados demuestran que la prueba radical libre de DPPH por si misma no es predictiva de una capacidad Aox's para la función efectivamente en la piel para proteger los lípidos de la peroxidación de la formación de ROS inducida por UV.

Imagenología en microscopio fluorescente de dos fotones del estrato córneo.

La imagenología de intensidad fluorescente de dos fotones se realizó *ex vivo* en piezas de la piel del pecho humano (~ 0,5 cm x 0,5 cm) para detectar y cuantificar niveles de especies de oxígeno reactivo inducidas por UV (ROS) en el estrato córneo usando procedimientos descritos previamente (Hanson KM, Clegg RM. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 76(1): 57-63). Las fórmulas de prueba se aplicaron a la superficie de las muestras de piel en 2 mg/cm² usando la punta de un varilla de vidrio. Antes de la irradiación, las muestras de piel se incubaron en 100 μmolar de dihidrorodamina (DHR) en etanol de solución amortiguadora salina de fosfato. Las particiones de DHR en el tejido donde se hicieron reaccionar con ROS inducido por UV para producir rodamina-123 altamente fluorescente, que se forma en imágenes posteriormente y cuantifica como una medición de la formación de ROS inducida por UV. Al menos dos área únicas se forman en imágenes de cada muestra de piel y en cada profundidad. Una fórmula base sin activos o antioxidantes de filtro solar se usó como un control.

Las imágenes mostradas en la Figura 2 demuestran que la extensión de la formación de ROS inducida por UV que resulta dentro del grosor completo del estrato córneo después de que cada fórmula se aplicó a las piezas intactas de la piel humana e irradió. Las imágenes demuestran claramente que la exposición a 4 MEDs de la radiación UV de

espectro completo genera formación de ROS abundante. La aplicación de una fórmula de filtro solar de espectro amplio SPF 30 antes de la irradiación reduce la formación de ROS al 39 % con relación a la fórmula de control en virtud de su capacidad para absorber UV antes puede interactuar con la piel para generar ROS. Sin embargo, la aplicación de una fórmula SPF 30 más antioxidantes (0,5 % de vitamina E, 0,1 % de Emblica) reduce la formación de ROS por un total de 73 % con relación a la fórmula de control, que representa una reducción adicional en ROS de 34 % comparado con la fórmula que solamente contiene los activos de filtro solar.

De esta manera, estos resultados demuestran convincentemente que la adición de antioxidantes del tipo y nivel derecho pueden complementar los filtros solares como una estrategia adicional para proteger la piel de los efectos perjudiciales de la formación de ROS inducida por UV. La exposición de la piel a UVR puede generar una abundancia de ROS aún a través de una capa protectora de filtro solar SPF 30 de espectro amplio. Con la potencia para neutralizar ROS, los antioxidantes (Aox) pueden proporcionar niveles medibles y significativos de protección contra los efectos perjudiciales de ROS y de esta manera significativamente aumentar la potencia protectora de los filtros solares proporcionados, sin embargo, tal Aox para uso en filtros solares se seleccionan apropiadamente.

Protección a través de la capa basal con combinación de antioxidante

15 A. Inhibición de peroxidación de lípido

La vitamina E es altamente efectiva en neutralizar ROS inducido por UV en la capa exterior de la epidermis, el estrato córneo. Las formulaciones de placebo y experimentales se prepararon para comparar la capacidad de las formulaciones para inhibir la peroxidación de lípido. Las formulaciones usadas se muestran en la Tabla 2,

Tabla 2

20 Lociones de placebo y antioxidante usadas en los estudios de franjas de cinta

Ingrediente	Loción de placebo %, p/p	Loción de placebo %, p/p	Loción antioxidante %, p/p	Loción antioxidante %, p/p
Parte A				
Agua purificada con USP	86,75	86,75	86,15	85,35
Simulgel NS	2,00		-	2,00
Sepigel 305	-	2,00	2,00	-
Sulfato cetearilo de sodio	0,250	0,25	0,25	0,25
Emblica			0,1	-
Parte B				
Palmitato de octilo	10,0		-	10,0
Laurato de isopropilo	-	10,0	10,0	-
Vitamina E	-		0,50	0,50
Oxynex ST	-		-	0,90
Parte C				
Germaben II	1,00	1,00	1,00	1,00

Las formulaciones se prepararon al agregar sulfato cetearilo de sodio al agua de la parte A y mezclar, seguido por la adición de ya sea Simulgel NS o Sepigel 305 y mezclando rigurosamente. Luego los ingrediente de la parte se agregaron con mezcla, seguido por Germaben II en la parte C. Después todos los ingredientes se agregaron, la emulsión se mezcló rigurosamente.

Usando el procedimiento de franjas de cinta ex vivo como se describe arriba, una composición que contiene vitamina E, por si misma o en combinación con Emblica, se encontró para ser altamente efectiva en lípidos de la piel protegidos en su superficie exterior de la oxidación inducida por UV mediada por ROS (Tabla 3).

Tabla 3

Antioxidante	% de inhibición de LOOH
0,05 % de vit E	-3,40
0,10 % de vit E	28,4
0,25 % de vit E	61,0
0,1 % de Emblica	19,6
0,3 % de Emblica	10,9

(continuación)

Antioxidante	% de inhibición de LOOH
0,05 % de vit E + 0,1 % de Emblica	28,1
0,10 % de vit E+ 0,1 % de Emblica	47,8
0,25 % de vit E+ 0,1 % de Emblica	65,0
0,50 % de vit E + 0,1 % de Emblica	74,4

B. Microscopio de fluorescencia de dos fotones

5 El microscopio de fluorescencia de dos fotones luego se condujo en una formulación que contiene Vitamina E y Emblica para determinar la capacidad para inhibir la formación de ROS. Los procedimientos usados fueron similares a aquellos como se describen arriba, usando microscopio confocal para visualizar las células en diferentes profundidades dentro de piezas intactas de la piel y luego la fluorescencia para cuantificar la extensión de la formación de ROS. En el experimento actual, sin embargo, en lugar de usar piel de pecho humano, la piel usada fue el modelo de piel EpiDerm™ (MatTek Corporation, Mass. EE.UU.), que consiste de queratinocitos epidermal

10 derivada de humano, normal que se ha cultivado para formar un modelo altamente diferenciado, de capas múltiples de la epidermis humana. Ultraestructuralmente, el modelo de piel EpiDerm™ muy paralelo a la piel humana, de esta manera proporciona un modelo in vitro útil para estudiar la capacidad de antioxidantes para neutralizar ROS formado durante la exposición a UVR bajo la capa basal.

15 Antes de la exposición a UVR, las piezas de piel EpiDerm™ se trataron con dihidrorodamina, las cuales se dividieron a lo largo de las regiones acuosas y de lípidos del tejido. Durante la exposición a UVR, la dihidrorodamina en el tejido reacciona químicamente con ROS donde se forma para generar una molécula altamente fluorescente. La fluorescencia se detecta posteriormente y cuantifica para proporcionar una indicación del nivel de ROS inducido por UV formado en capas más profundas de la piel. Al aplicar antioxidantes tópicamente antes de la formación ROS de la irradiación pueden medirse y compararse con el ROS formado después se aplicó a la piel una loción de placebo

20 sin antioxidantes. De esta manera, la eficacia de antioxidantes para neutralizar ROS dentro de las capas más profundas de la piel puede medirse y se establecen sus eficiencias relativas.

Usando este procedimiento, la formulación experimental que contiene vitamina E y emblica se trató para determinar su capacidad para neutralizar ROS dentro de la capa basal o capa inferior de la epidermis después de la exposición a 4 MED. La formulación experimental y la loción de placebo usados en este experimento se prepararon como sigue.

25

Tabla 4 – Loción de placebo

Parte A	Agua purificada con USP polímero cruzado de acrilatos/ acrilato de alquilo c10-30	60,04 % 0,30 %
Parte B	Propilenglicol EDTA de disodio Trietanolamina, 99 %	5,00 % 0,01 % 0,35 %
Parte C	Palmitato de octilo Copolímero de PVP/Eicoseno Ácido esteárico Diestearato de poligliceril-3 Metilparabeno Isostearato de sorbitan Propilparabeno Dimeticona, 50 cst	29,00 % 2,00 % 0,50 % 0,29 % 0,30 % 0,71 % 0,10 % 0,40 %
Parte D	Alcohol bencílico	1,00 %

Tabla 5 – Loción antioxidante

Parte A	Agua purificada con Usp polímero cruzado de acrilatos/acrilato de alquilo c10-30	58,54 % 0,30 %
Parte B	Propilenglicol EDTA de disodio Trietanolamina, 99 %	5,00 % 0,01 % 0,35 %

(Continuación)

Parte C	Palmitato de octilo	29,00 %
	Copolímero de Pvp/eicoseno	2,00 %
	Ácido esteárico	0,50 %
	Diestearato de poligliceril-3	0,29 %
	Metilparabeno	0,30 %
	Isostearato de sorbitan	0,71 %
	Vitamina E, tocoferol de alfa dl	0,50 %
	Emblica	0,10 %
	Propilparabeno	0,10 %
	Dimeticona, 50 cst	0,40 %
Parte D	Alcohol bencílico	1,00 %

5 Una fase de agua se creó al agregar Acrilatos/crosspolímero de acrilato de alquilo C10-30 al agua de la parte A mientras se agita y mezcla hasta limpia y libre de grumos. Mientras se mezcla, el propilenglicol y EDTA de sodio se agregaron a la mezcla de fase de agua de la Parte A y se mezcló bien durante 10 minutos. La trietanolamina de la Parte B luego se agregó a la mezcla de la fase de agua y se continuó mezclando bien. De manera separada una fase de aceite se creó al mezclar los ingredientes de la Parte C juntos y calentados hasta 140-145°F (60°-62,7°C) mientras que se mezcla bien. La fase de aceite luego se agregó a la fase de agua y se continuó mezclando para formar una emulsión. La emulsión se enfrió hasta temperatura ambiente y luego el alcohol bencílico de la parte D se agregó a la emulsión fría y se mezcló completamente. Se agregó agua adicional CS para darle cuerpo. La diferencia entre la formulación de placebo y experimental fue la adición de antioxidantes en la fase de aceite.

10 Como se muestra en la Figura 3, mientras que altamente efectiva en las capas exteriores de la epidermis, la combinación de 0,5 % de vitamina E y 0,1 % de emblica solamente reducen la formación de ROS en la capa basal de la epidermis por aproximadamente 5 %.

15 Después se evaluó un amplio intervalo de ingredientes usados dentro de la industria cosmética para su capacidad antioxidante reivindicada, y fueron sorprendentes al observar que muchos de ellos se comportan como pro-oxidantes en la capa basal en la piel expuesta a UVR. Como se demuestra en la Figura 4, en lugar de disminuir los niveles de ROS, estos ingredientes incrementan los niveles de ROS por hasta 250 % dentro de la capa basal de la epidermis con relación a una loción de placebo sin ningún antioxidante. Muchos de estos ingredientes que se comportan como pro-oxidantes representan extractos de plantas naturales de semillas hinojo, rosas y uvas blancas. Juntos estos resultados demuestran que los antioxidantes usados en productos para cuidados del sol donde la exposición al sol intencional se encuentra necesaria para seleccionarse juiciosamente. Por lo tanto las pruebas demuestran que los procedimientos de la invención revelan que no todos los ingredientes identificados como "antioxidantes" proporcionan propiedades antioxidantes actuales en el mundo real usados con exposiciones a UVR.

25 Después se probó una formulación experimental que contiene una combinación de antioxidante de vitamine E y dietilhexil siringiliden malonato (Oxynex® ST, Merck KGaA, Alemania) para determinar si la combinación deberá ser protección efectiva contra la formación de ROS inducido por UV a lo largo de la epidermis. Las formulaciones de placebo y experimentales se prepararon similar a los procedimientos descritos arriba:

Tabla 6 – Loción de placebo

Parte A	Agua purificada con USP	60,04 %
	polímero cruzado de acrilatos/acrilato de alquilo c10-30	0,30 %
Parte B	Propilenglicol	5,00 %
	EDTA de sodio	0,01 %
	Trietanolamina, 99 %	0,35 %
Parte C	Palmitato de octilo	29,00 %
	Copolímero de PVP/Eicoseno	2,00 %
	Ácido esteárico	0,50 %
	Diestearato de poligliceril-3	0,29 %
	Metilparabeno	0,30 %
	Isostearato de sorbitan	0,71 %
	Propilparabeno	0,10 %
	Dimeticona, 50 cst	0,40 %
Parte D	Alcohol bencílico	1,00 %

30

Tabla 7 – Loción antioxidante

Parte A	Agua purificada con Usp	58,54 %
	Polímero cruzado de acrilatos/ acrilato de alquilo c10-30	0,30 %
Parte B	Propilenglicol	5,00 %
	EDTA de disodio	0,01 %
	Trietanolamina, 99 %	0,35 %
Parte C	Palmitato de octilo	29,00 %
	Copolímero de Pvp/eicoseno	2,00 %
	Ácido esteárico	0,50 %
	Diestearato de poligliceril-3	0,29 %
	Metilparabeno	0,30 %
	Isostearato de sorbitan	0,71 %
	Vitamina E, tocoferol de alfa dl	0,50 %
	Dietilhexil siringiliden malonato	0,90 %
	Propilparabeno	0,10 %
	Dimeticona, 50 cst	0,40 %
Parte D	Alcohol bencílico	1,00 %

Se creó una fase de agua al agregar polímero cruzado de acrilatos/acrilato de alquilo C10-30 al agua de la Parte A mientras se agita y mezcla hasta que está limpia y libre de grumos. Mientras se mezcla, el propilenglicol y EDTA de disodio se agregaron a la mezcla de la fase de agua de la Parte A y se mezclaron bien durante 10 minutos. La trietanolamina de la Parte B luego se agregó a la mezcla de la fase de agua y se continuó mezclando bien. De manera separada una fase de aceite se creó al mezclar los ingredientes de la Parte C juntos y se calentaron hasta 140-145°F (60°-62,7°C) mientras se mezclan bien. La fase de aceite luego se agregó a la fase de agua y se continuó mezclando para formar una emulsión. La emulsión se enfrió hasta temperatura ambiente y luego el alcohol bencílico de la parte D se agregó a la emulsión fría y se mezcló completamente. Se agregó agua adicional CS para darle cuerpo. La diferencia entre la formulación de placebo y experimental fue la adición de antioxidantes en la fase de aceite.

Como se muestra en la tabla 8 y Figuras 5 y 6, los resultados ROS in Vitro demuestran que una loción que contienen tanto la Vitamina E como OxyneX® ST juntos proporcionan protección sustancialmente más alta de la formación ROS inducida por UV que puede lograrse por la Vitamina E y Emblica.

Tabla 8

Antioxidante	% ROS neutralizado en la capa basal
Después de 1 exposición a MED	
0,5 % de Vitamina E + 0,1 % de Emblica	ND
0,5 % de Vitamina E + 0,9 % de OxyneX ST	47
Después de 4 exposiciones a MED	
0,5 % de Vitamina E + 0,1 % de Emblica	5
0,5 % de Vitamina E + 0,9 % de OxyneX ST	33
ND = no determinado.	

La adición de OxyneX® ST a una loción que contiene Vitamina E neutralizada 33 % ROS después de la exposición a 4 MED de UVR y neutralizada 47 % ROS después de 1 MED UVR dentro de la capa basal. Estos resultados son significativamente mejores que la neutralización de ROS al 5 % para una loción que contiene solamente la Vitamina E y Emblica.

Las composiciones que contienen la combinación de 0,5 % de Vitamina E y 0,9 % de Oxydex[®] ST también se probaron en las pruebas de peroxidación de lípidos descritas arriba y se mostraron para prevenir la peroxidación de lípidos inducida por UV al 75 %. Esto es comparable con los resultados obtenidos para el 0,5 % de la Vitamina E más 0,1 % de la Emblica. Sin embargo, aunque las composiciones fueron similares en la capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos, al combinar la Vitamina E con Oxydex[®] ST se observó un incremento inesperado en la protección de la formación de ROS que cruza el espesor completo de la epidermis.

Estos resultados también confirman que Oxydex[®] ST mantiene su capacidad antioxidante dentro de la piel cuando se expone a UVR en lugar de convertirse en un pro-oxidante. Tomados juntos, estos resultados demuestran que los beneficios inesperados de la vitamina E combinada con Oxydex[®] ST para la protección contra la formación de ROS inducida por UV dentro del espesor completo de la epidermis.

Evaluación de la eficacia clínica cosmética de la formulación del antioxidante SPF alto

Dos formulaciones de filtro solar antioxidantes tópicos se generaron de acuerdo a los procedimientos de la invención que contiene los filtros solares y cargas antioxidantes:

Ingrediente	SPF 70	SPF 30
Filtro solar		
Homosalato	15 %	15 %
Octocrileno	10 %	2 %
Avobenzona	3 %	2 %
Oxibenzona	6 %	5 %
Octisalato	5 %	5 %
Antioxidante		
Malonato de dietilhexil siringilideno	0,9 %	-
Vitamina E	0,5 %	0,5 %
Emblica	-	0,01 %
Todos los porcentajes son p/p.		

15 La prueba SPF *in vivo* se realizó de conformidad a los protocolos de prueba aprobados por la F.D.A. de E.U.A. determinados de la relación de la primera formulación como al menos SPF 70 y la segunda fue al menos SPF 30, Para conveniencia estos refieren en el presente documento como SPF 70 y SPF 30, Los procedimientos de medición *in vitro* e *in vivo* del SPF se describen, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. N.º 20070160549 y 20080081024,

20 Una evaluación de eficacia clínica se realizó para determinar el efecto de las formulaciones antioxidante de SPF alto producidas como se describen arriba en diversas indicaciones de la salud de la piel incluyendo, sequedad en la piel (humedad), textura de la piel (rugosidad, suavidad), elasticidad (esto es, firmeza o resistencia), tono de la piel y claridad, uniformidad de la pigmentación, líneas finas y arrugas, eritema, fotodaños, y daño oculto (pigmentación subclínica). El estudio es una prueba ciega sencilla, paralela, aleatoria, controlada, de doce (12) semanas de uso con un periodo de equilibrio de la línea base adicional de siete (7) días. Ciento nueve (109) sujetos se registraron y ciento cinco (105) continuaron en el estudio. Cuatro (4) sujetos se descontinuaron debido a la incapacidad para hacer todas las visitas programadas de manera regular. No hay experiencias adversas reportadas. Los resultados a continuación demuestran mejora significativa sobre el estado basal de la piel como un resultado de 12 semanas de uso de los productos de prueba.

30 Los sujetos calificados se dividieron en dos (2) grupos del producto y un grupo de control no tratado. Un evaluador experto clínico clasifica la cara de cada sujeto en cada visita para evaluar los parámetros individuales que contribuyen a las propiedades visuales y de tacto de envejecimiento prematuro, así como para proporcionar una evaluación global general del grado de fotodaño visible. Los registros de clasificación clínicos en la línea base se usaron para confirmar que los sujetos presentes con foto daño leve hasta moderado y por lo tanto se calificaron para

la participación.

Los atributos específicos se cuantificaron usando la bioinstrumentación; réplicas de resina silástica con análisis de imágenes para también medir las líneas finas y arrugas, un metro Nova para determinar el contenido de humedad y un dispositivo de succión Dermalab para medir la elasticidad de la piel. Un fotógrafo fotografió a cada uno de los sujetos en la línea base, 2, 4, 8 y 12 semanas usando un aparato de cámara clínica Canfield de luz polarizada cruzada y estándar de ángulo fijo para documentar la apariencia de un sitio específico en el lado de la cara (incluyendo el área de las patas de gallo). El fotógrafo toma las fotografías que reflejan la UV de la cara completa, una línea base y en la visita en la semana 12 o hasta que el producto se ha eliminado y ya no hay fluorescencias (lo que ocurra más tarde). El evaluador clínico experto clasifica las fotografías de UV tomadas en la línea base y 12 semanas (\pm días de reposo farmacológico) para evaluar el grado del daño "oculto" subclínico presente y luego se evaluó globalmente la cantidad del cambio comparado con la línea base.

Las composiciones de la prueba se cubrieron para ocultar la identidad del fabricante y etiquetaron con los códigos del artículo de prueba apropiados y las direcciones de uso. Aproximadamente la mitad del producto del estudio se administró antes del inicio del estudio y la segunda mitad del producto de administró previo al punto medio del estudio.

Siete hasta diez días previos al inicio del periodo de tratamiento, los sujetos experimentaron un periodo de equilibrio en la línea base, durante el cual se suspendió el uso de todos los filtros solares faciales, productos de tratamiento de la piel, su barra o crema de limpieza facial actual, y cualquier producto cosmético facial humectante; uso diario del jabón Camay, cada mañana para la limpieza facial y como sea necesario a lo largo del día, y se abstiene del uso de camas de bronceado por la duración del estudio.

Después del periodo de equilibrio, los sujetos se calificaron al presentarse con señales suficientes de sequedad y envejecimiento de piel extrínseca. Después de la calificación, los sujetos se asignaron aleatoriamente a uno de los dos grupos de prueba o al grupo de control no tratado. Por la duración del estudio los sujetos asignados a los grupos tanto de tratamiento como sin tratamiento lavan sus caras solamente con el jabón Camay proporcionado. Los sujetos en ambos de los grupos del tratamiento aplicaron el artículo de prueba asignado a su cara (y cuello si se desea) una vez diariamente (cada mañana), luego se volvió a aplicar como sea necesario.

Los sujetos registran los tiempos de aplicación en cada día en un diario proporcionado por el sitio de estudio en cada visita. Los sujetos en el grupo sin tratamiento registraron el número de veces que se limpiaron y aplicaron su humectante, filtro solar y productos de cosmético de color usuales durante el estudio. Los diarios se colectaron y se volvieron a distribuir en la misma manera como se resumen para los grupos de tratamiento.

Todos los sujetos tienen evaluaciones de la piel clínicas, Nova Meter, Dermalab, replicas de resina Silástica y fotografía de luz estándar después de 2, 4, 8 y 12 semanas. Los sujetos tienen fotos UV tomadas solamente en la línea base y 12 semanas (\pm días para el reposo farmacológico) por un evaluador clínico experto que no tenía conocimiento del producto asignado, ni que sujetos estuvieron en los grupos de tratamiento y que sujetos estuvieron en el grupo de control no tratado.

Las evaluaciones se hicieron en cada visita para diversos indicadores de fotodaño enlistados a continuación. Las escalas de grados se resumen en cada una de las categorías.

A. Evaluación general de grado de fotodaño.

Los sujetos se clasificaron en una escala de 0-10 con 0 que representa sin fotodaño y 10 que representa fotodaño severo. Los resultados fueron como sigue:

Tabla 9

	REGISTRO DE FOTODAÑO GENERAL MEDIO \pm S.D. (% DE MEJORA)		
	SPF 30	SPF 70	CONTROL
BASAL	4,80 \pm 0,97 (n=39)	4,72 \pm 0,84 (n=39)	4,71 \pm 0,79 (n=27)
SEMANA 2	4,41 \pm 0,73* (8) (n=39)	4,45 \pm 0,51* (5) (n=39)	4,44 \pm 0,60* (6) (n=27)
SEMANA 4	4,04 \pm 0,62* (16) (n=39)	4,15 \pm 0,68* (12) (n=39)	4,14 \pm 0,60* (12) (n=27)
SEMANA 8	4,40 \pm 0,70* (8) (n=39)	4,42 \pm 0,51*(6) (n=37)	4,48 \pm 0,64 ^T (5) (n=26)
SEMANA 12	3,97 \pm 0,49* (17) (n=39)	3,86 \pm 0,38* (18) (n=39)	3,95 \pm 0,38* (16) (n=27)
*Significativamente diferente que el valor de línea base, p \leq 0,050. ^T En tendencia significativamente diferente que el valor de línea base, p=0,150-0,051.			

B. Sequedad facial.

Los sujetos se dieron los grados de 0-4 como sigue:

Opiel normal; sin señales de sequedad

1sequedad leve; ligera pero sequedad definida, fina descamación presente puede tener una apariencia polvorienta o ceniza

2sequedad moderada; descamación algo más gruesa, algunas grietas evidentes como escaladas elevadas.

3sequedad marcada; descamación marcada gruesa, evidentes grietas como escalas elevadas.

4sequedad severa; muy marcada; descamación muy gruesa; descamación progresiva a fisuras; eritema puede estar presente.

10 Los resultados fueron como sigue:

Tabla 10

	PUNTUACIÓN MEDIA DE LA SEQUEDAD ± S.D. (% DE MEJORA)		
	SPF 30	SPF 70	CONTROL
BASAL	0,97±0,16 (n=39)	1,05±0,22 (n=39)	1,07±0,26 (n=27)
SEMANA 2	0,20±0,52* (79) (n=39)	0,23±0,48* (78) (n=39)	0,11±0,32* (90) (n=27)
SEMANA 4	0,12±0,40* (88) (n=39)	0,15±0,36* (86) (n=39)	0,18±0,48* (83) (n=27)
SEMANA 8	0,33±0,57* (66) (n=39)	0,10±0,31* (91) (n=37)	0,26±0,53* (76) (n=26)
SEMANA 12	0,00±0,00* (100) (n=39)	0,00±0,00* (100) (n=39)	0,11±0,32* (90) (n=27)

C. Textura (aspereza/suavidad)

Los sujetos se clasificaron a partir de un registro de 0, suave indicación, aún superficie, hasta 10 indicando una superficie áspera, gruesa, irregular. Los resultados fueron como sigue:

15

Tabla 11

	PUNTUACIÓN MEDIA DE LA TEXTURA± S.D. (% DE MEJORA)		
	SPF 30	SPF 70	CONTROL
BASAL	3,68±0,69 (n=39)	3,86±0,61 (n=39)	3,64±0,63 (n=27)
SEMANA 2	2,24±1,00* (39) (n=39)	2,56±0,94* (34) (n=39)	2,35±1,02* (35) (n=27)
SEMANA 4	2,58±0,97* (30) (n=39)	2,25±1,17* (42) (n=39)	2,30±1,02* (37) (n=27)
SEMANA 8	2,62±0,87* (29) (n=39)	2,88±1,95* (25) (n=37)	2,70±0,87* (26) (n=26)
SEMANA 12	2,52±0,74* (32) (n=39)	2,35±0,73* (39) (n=39)	2,64±0,64* (28) (n=27)

*Significativamente diferente que valor de línea base, p≤0,050.

D. Elasticidad/firmeza/resistencia

Los sujetos se clasificaron de un registro de 0, indicando consistencia, elasticidad, piel tensa, hasta 10 indicando piel que se desprendió, flácida, sin rigidez. Los resultados fueron como sigue:

20

Tabla 12

	REGISTRO DE ELASTICIDAD/FIRMEZA/RESISTENCIA MEDIO ± S.D. (% DE MEJORA)		
	SPF 30	SPF 70	CONTROL
LÍNEA BASE	5,16±1,13 (n=39)	5,18±0,94 (n=39)	5,21±1,03 (n=27)
SEMANA 2	4,24±1,13* (18) (n=39)	4,19±1,06* (19) (n=39)	4,21±1,20* (19) (n=27)
SEMANA 4	4,15±0,97* (20) (n=39)	4,00±0,80* (23) (n=39)	4,30±1,08* (18) (n=27)
SEMANA 8	3,77±0,94*(27) (n=39)	3,81±0,92*(26) (n=37)	4,05±1,00* (22) (n=26)
SEMANA 12	3,33±0,92* (36) (n=39)	3,29±1,03* (37) (n=39)	3,67±0,87* (30) (n=27)

*Significativamente diferente que el valor de línea base, p≤0,050.

E. Líneas y arrugas

Los sujetos se clasificaron a partir de un registro de 0, no indicando líneas o arrugas, hasta 10 indicando piel gruesa que contiene numerosas arrugas. Los resultados fueron como sigue:

Tabla 13

	REGISTRO DE LINEAS FINAS/ARRUGAS MEDIO \pm S.D. (% DE MEJORA)		
	SPF 30	SPF 70	CONTROL
LÍNEA BASE	4,12 \pm 1,42 (n=39)	4,78 \pm 1,32 (n=39)	4,44 \pm 1,58 (n=27)
SEMANA 2	3,92 \pm 1,18 (5) (n=39)	4,28 \pm 0,72* (11) (n=39)	4,37 \pm 1,21 (2) (n=27)
SEMANA 4	4,12 \pm 0,95 (0) (n=39)	4,15 \pm 0,80* (13) (n=39)	4,07 \pm 1,29 ^T (8) (n=27)
SEMANA 8	3,55 \pm 0,90*(14) (n=39)	3,75 \pm 0,74*(22) (n=37)	3,81 \pm 0,97*(14) (n=26)
SEMANA 12	3,28 \pm 0,89* (20) (n=39)	3,58 \pm 0,69* (25) (n=39)	3,49 \pm 1,06* (21) (n=27)
*Significativamente diferente que el valor de línea base, p<0,050, ^T En tendencia significativamente diferente que el valor de línea base, p-0,150-0,051.			

5

F. Tono de piel / claridad

Los sujetos se clasificaron a partir de un registro de 0, indicando piel clara, radiante, translúcida, hasta 10 indicando piel que se puso pálida, descolorida y/o había tono de piel disparejo. Los resultados fueron como sigue:

Tabla 14

	REGISTRO DE TONO DE PIEL MEDIA \pm S.D. (%MEJORAMIENTO)		
	SPF 30	SPF 70	CONTROL
BASAL	5,57 \pm 0,81 (n=39)	5,40 \pm 0,65 (n=39)	5,44 \pm 0,85 (n=27)
SEMANA 2	5,07 \pm 0,69* (9) (n=39)	5,11 \pm 0,60* (5) (n=39)	5,33 \pm 0,56 (2) (n=27)
SEMANA 4	4,90 \pm 0,70*(12) (n=39)	4,78 \pm 0,77*(12) (n=39)	4,84 \pm 0,76*(11) (n=27)
SEMANA 8	4,62 \pm 0,68*(17) (n=39)	4,50 \pm 0,69*(17) (n=37)	4,53 \pm 0,79*(17) (n=26)
SEMANA 12	4,14 \pm 0,75*(26) (n=39)	3,92 \pm 0,80*(27) (n=39)	3,98 \pm 0,62*(27) (n=26)
*Significativamente diferente al valor de la línea base, p \leq 0,050.			

10

G. Uniformidad de pigmentación

Los sujetos se agregaron de un registro de 0, indicando uniforme, incluso pigmentación, hasta 10 indicando piel que fue desigual, llena de manchas o moteado. Los resultados son como siguen:

Tabla 15

	UNIFORMIDAD MEDIA DE REGISTRO DE PIGMENTACION \pm S.D. (% MEJORAMIENTO)		
	SPF 30	SPF 70	CONTROL
BASAL	5,07 \pm 0,94 (n=39)	4,90 \pm 0,99 (n=39)	4,95 \pm 1,09 (n=27)
SEMANA 2	4,80 \pm 0,74 ^T (5) (n=39)	4,67 \pm 0,77 ^T (5) (n=39)	4,76 \pm 0,73 (4) (n=27)
SEMANA 4	4,99 \pm 0,89 (2) (n=39)	4,81 \pm 0,90 (2) (n=39)	4,84 \pm 0,84 (2) (n=27)
SEMANA 8	4,42 \pm 0,66*(13) (n=39)	4,38 \pm 0,59*(11) (n=37)	4,37 \pm 0,78*(12) (n=26)
SEMANA 12	4,14 \pm 0,73*(18) (n=39)	4,04 \pm 0,78*(18) (n=39)	3,97 \pm 0,69*(20) (n=27)
*Significativamente diferente al valor de línea base, p \leq 0,050, ^T Tendencia significativamente diferente al valor de línea base, p-0,150-0,051.			

15

H. Eritema

Los sujetos se graduaron desde una marca de 0, indicando sin eritema o tono normal, hasta 10 indicando piel que fue marcada, muy roja. Los resultados son como siguen:

Tabla 16

	VALOR DE METRO NOVA MEDIO ± S.D. (% MEJORAMIENTO)		
	SPF 30	SPF 70	CONTROL
BASAL	202,55±87,93 (n=39)	203,12±88,65 (n=39)	218,92±114,92 (n=27)
SEMANA 2	179,17±64,82 ^T (-12) (n=39)	180,15±74,05 ^T (-11) (n=39)	196,22±86,17 (-10) (n=27)
SEMANA 4	160,17±42,24* (-21) (n=39)	177,0±72,68* (-13) (n=39)	191,74±77,53 (-12) (n=27)
SEMANA 8	158,97±39,01*(-22) (n=39)	150,10±38,63*(-26) (n=37)	166,73±57,76*(-24) (n=26)
SEMANA 12	169,89±45,02* (-16) (n=39)	182,35±60,00 ^T (-10) (n=39)	179,59±62,21* (-18) (n=27)
*Significativamente diferente al valor de línea base, p<0,050, ^T Tendencia significativamente diferente al valor de línea base, p=0,150-0,051.			

5

El estado de la piel facial se midió en todos los sujetos usando Dermalab, Novameter y análisis de imagen de replica en línea base y semanas 2, 4, 8 y 12 como sigue.

La elasticidad se midió en un lado de la cara de la superficie (misma ubicación en cada visita) en todos los sujetos se usa el Dermalab (Cortex Technology, Dinamarca), el cual aplica una presión negativa a la superficie de la piel y calcula la altura para que la piel se pueda trazar y la relación la cual regresa al equilibrio así proporcionando una medida de elasticidad. Las mediciones Dermalab toman lugar en el lado opuesto de la cara como replicas de análisis de imagen.

La humedad se midió en cada lado de la cara (misma ubicación en cada visita) para documentos de niveles de hidratación de la superficie de la piel. El grado relativo de hidratación de la piel se valora usando el Dermal Phase Meter 9003 (NOVA meter). Las mediciones se hacen al aplicar un voltaje alternativo a la piel con un par de espacio cerrado de electrodos y mide la impedancia. Los cambios en contenido de agua cambian la impedancia del circuito de capacidad. Las primeras dos lecturas consecutivas dentro del 10 % se registraron. El mismo lado de la cara se mide en cada visita. La temperatura y humedad del cuarto de prueba se registrará durante cada conjunto de lecturas.

El análisis de perfil (textura de superficie) proporciona un procedimiento para cuantificar ampliación de la piel, la acción cosmética de reducir líneas y arrugas. Durante este procedimiento, las replicas de piel hechas del área de las patas de gallo se analizaron para textura de superficie y perfil usando análisis de imagen. Las replicas de piel del área de patas de gallo se prepararon usando materiales de impresión de resina silástica (Cuderm). La resina silástica es un líquido rápidamente curado que se aplica usando anillos de replica de 1cm de diámetro que quedan intactos después de la aplicación y remoción.

Las condiciones de piel facial se documentaron para todos los sujetos usando fotografía estándar y de luz de polarizado cruzado en línea base y semanas 2, 4, 8 y 12, El daño oculto acumulado debajo de la superficie de la piel se evaluó por niveladores expertos, con base en fotos UV tomadas en la línea base y 12 semanas.

Las fotografías digitales usando luz tanto visible como polarizada cruzada se toman de todos los sujetos en todas las visitas. Las caras de los sujetos se colocan en el aparato de de recolocación estereotáctico Canfield y las fotografías se toman usando la cámara de Canfield Clinical Systems y sistema de destello. La cámara usada fue un modelo Nikon D80 SLR 35 mm con una lente de 60 mm macro Nikkor y una cabeza de destello modificada SB-23, La cámara se coloca en apertura de prioridad automática a f 16, Para cada sujeto en cada intervalo de tiempo, una pizarra fue fotografiada a 1:6 de aumento que identifica al sujeto e intervalo de tiempo. Una foto de frente se tomó a 1:6 de aumento y dos fotos a 45° de ángulo lateral de cada lado de la cara se toman a 1:4 y 1:3 de aumento usando iluminación estándar y se repite usando luz de polarizado cruzado.

Los sujetos colocan sus cabezas en el dispositivo de recolocación estereotáctico Canfield y tienen fotografías tomadas usando el sistema de cámara del Canfield Clinical Systems. La cámara usada fue un modelo Nikon 6006 SLR 35 mm. Para cada sujeto en cada intervalo de tiempo, una pizarra se fotografió a 1:6 de aumento identificando el sujeto e intervalo de tiempo. Una foto de frente se tomó a 1:6 de aumento y una foto a 45° de ángulo lateral de cada lado de la cara se tomó a 1:6 de aumento. Posteriormente, dos fotografías con luz UV de frente (UV reflejada) se tomaron a 1:6 de aumento empleando un filtro Kodak 18A sobre los lentes, una película de impresión en blanco y negro Sunpak MS 4000 Monolight y T-Max 400, Las exposiciones se tomaron a f8 y 1/250 seg. de velocidad del obturador.

ES 2 637 516 T3

Un evaluador experto gradúa las fotos faciales completas individualmente para uniformidad de pigmentación en cada punto de tiempo (línea base y 12 semanas) graduada en una escala de 0 (uniforme/igual) hasta 10 (desigual, lleno de manchas moteadas). El evaluador experto también conduce una evaluación comparativa de fotos de 12 semanas contra el valor basal para cada sujeto individualmente. Las escalas de gradación son desde -4 hasta +4 como sigue:

- 5 -4 incremento extremo en hiperpigmentación
- 3 incremento moderado en hiperpigmentación
- 2 incremento medio en hiperpigmentación
- 1 incremento apenas perceptible (empeoramiento) en hiperpigmentación
- 0 sin diferencia entre línea base y semana 12
- 10 1 isminución apenas perceptible (mejoramiento) en hiperpigmentación
- 2 disminución media en hiperpigmentación
- 3 disminución moderada en hiperpigmentación
- 4 disminución extrema en hiperpigmentación

Formulaciones de ejemplo

- 15 Las formulaciones de filtro solar de ejemplo se preparan de acuerdo a los procedimientos descritos en el presente documento con los siguientes ingredientes:

Tabla 17

Ingrediente	Cantidad, % en p/p
Agua Purificada	45,0 – 90,0
Homosalato	5,0 – 15,0
Octocrileno	2,0 – 10
Oxibenzona	0,5 – 6,0
Octisalato	5,0
Avobenzona	1,0 – 3,0
Prolipid 141	2,0 – 7,0
Butilen Glicol	2,0 – 7,0
Celulosa microcristalina/ Carboximetilcelulosa	0,2 – 5,0
Alcohol bencílico	0,5 – 2,0
Vitamina E	0,01 – 3,0
Malonato de sirigilideno de dietilhexilo	0,01 – 6,0
Extracto de fruta de Phylanthus Emblica	0,01 – 1,0
Extracto de té verde	0,01 – 1,0
Fosfatos de tocoferil de Lauriminodipropionato Disodio	0,3 – 3,0
Clorfenesina	0,10 – 0,20
PVP Butilado	0,05 - .50
EDTA de Disodio	0,01 - .20
Fosfato de ascorbilo de sodio	0,01 – 1,0
Palmitato de Vitamina A	0,01 – 1,0

REIVINDICACIONES

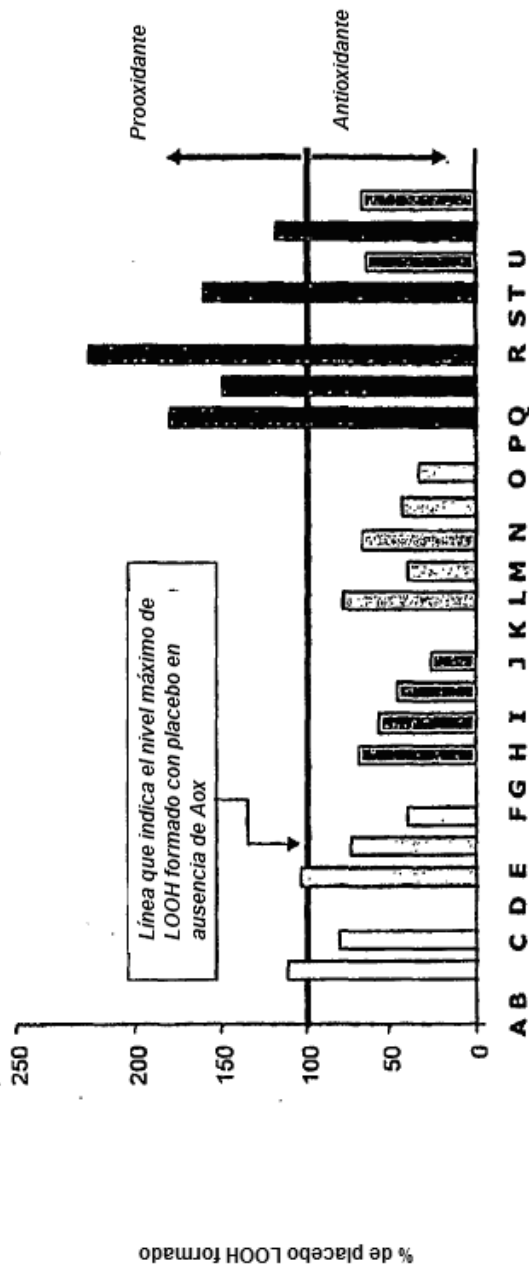
1, Un procedimiento *ex vivo* para seleccionar compuestos por su comportamiento antioxidante en una composición para aplicarse tópicamente a la piel, en el que el procedimiento de selección comprende determinar la capacidad del compuesto para inhibir la formación de tanto hidroperóxidos de lípidos en la piel inducidos por radiación ultravioleta e inhibir las especies de oxígeno reactivas inducidas por radiación ultravioleta en la epidermis;
 5 en el que la determinación de la inhibición de la formación de especies de oxígeno reactivas inducidas por radiación ultravioleta en la epidermis comprende la obtención de imágenes del tejido de la piel usando obtención de imágenes de intensidad de fluorescencia de dos fotones;
 10 y en el que la determinación de la inhibición de la formación de hidroperóxido de lípidos en la piel inducida por UVR comprende las etapas de aplicar en zonas distintas de la piel de un sujeto una composición que contiene antioxidantes y una composición de placebo para producir un sitio de la piel antioxidante que contiene antioxidante y lípidos de la piel y un sitio de la piel con placebo que contiene placebo y lípidos de la piel; aplicar una tira al sitio de la piel con antioxidante y al sitio de la piel con placebo para producir una muestra de la tira de antioxidante que contiene antioxidante y lípidos de la piel y una muestra de tira de placebo que contiene placebo y lípidos de la piel;
 15 retirar dichas muestras de tira de la piel y exponer dichas muestras de tira de la piel a UVR para formar un producto de reacción de antioxidantes/lípidos inducida por UVR en la muestra de tira con antioxidante y un producto de reacción de placebo/lípidos inducida por UVR en la muestra de tira con placebo; poner en contacto por separado la muestra de tira con antioxidante y la muestra de tira con placebo con disolvente para preparar un primer extracto que contiene producto de reacción de antioxidantes/lípidos inducido por UVR y un segundo extracto que contiene producto de reacción de placebos/lípidos inducido por UVR; analizar dichos extractos primero u segundo para el contenido de hidroperóxido de lípidos para cada extracto; y comparar el contenido de hidroperóxido de lípidos del primer extracto con el contenido de hidroperóxido de lípidos del segundo extracto.

2, El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la determinación de la inhibición de la formación de hidroperóxido de lípidos en la piel inducida por UVR comprende las etapas adicionales de aplicar placebo a dos
 25 sitios distintos en la piel del sujeto; producir muestras de tiras de cada sitio; someter las muestras de tiras de solo uno de los dos sitios de placebo a UVR para producir una subpoblación de muestras de tiras de placebo irradiadas y una subpoblación de muestras de tiras de placebo no irradiadas; poner en contacto por separado las muestras de tiras de placebo no irradiadas con disolvente para preparar un tercer extracto que contiene placebo y lípidos en la piel; y analizar dicho tercer extracto por el contenido de hidroperóxido de lípidos para determinar la formación basal
 30 de hidroperóxido de lípidos.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la comparación del contenido de hidroperóxidos de lípidos del primer extracto con el contenido de hidroperóxidos de lípidos del segundo extracto comprende calcular el porcentaje de formación de hidroperóxidos de lípidos por la siguiente fórmula:

$$\%LF = \frac{(LOOH1 - LOOH3) \times 100}{(LOOH2 - LOOH3)}$$

35 en la que el % de LF es el porcentaje de formación de hidroperóxidos de lípidos, LOOH1 es el contenido de hidroperóxidos de lípidos del primer extracto, LOOH2 es el contenido de hidroperóxidos de lípidos del segundo extracto, y LOOH3 es el contenido de hidroperóxidos de lípidos del tercer extracto.



- A - n-acetil cisteína (NAC) 0,25%
- B - Extracto de fruto de *Phyllanthus Emblica* 0,1%
- C - Vitamina E (Vit. E) 0,05%
- D - Vit. E 0,1%
- E - Vit. E 0,25%
- F - Vit. E 0,05%, Emblica 0,1%
- G - Vit. E 0,1%, Emblica 0,1%
- H - Vit. E 0,25%, Emblica 0,1%
- I - Vit. E 0,5%, Emblica 0,1%
- J - Extracto de té verde (GT) 0,1%
- K - Vit. E 0,25%, GT 0,1%
- L - Tetrahidrocurcuminoides (THC) 0,25%
- M - Vit. E 0,25%, THC 0,25%
- N - THC 0,5%
- O - Oleosina de *Rosemary officinalis* (ROO) 0,1%
- P - Extracto de *Rosa Galica* (Rosa G) 1,0%
- Q - Complejo fotosintético bioactivo de plantas verdes (BPSC) 0,1%
- R - Fermento de *Thermus Thermophilus* (Thermus) 1%
- S - *Thermus* 1%, Vit. E 0,25%
- T - Ergototaina (ET) 0,1%
- U - ET 0,1%, Vit. E 0,25%

