



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021010465-8 A2



(22) Data do Depósito: 26/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 24/08/2021

(54) **Título:** MÉTODO PARA DIMINUIR SECREÇÃO DE ENDOTELINA-1, SÍNTESE DE FATOR DE CÉLULA TRONCO OU CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNA EM UM QUERATINÓCITO

(51) **Int. Cl.:** A61K 8/29; A61K 8/37; A61Q 17/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 03/12/2018 US 62/774,669.

(71) **Depositante(es):** INTERNATIONAL FLAVORS & FRAGRANCES INC..

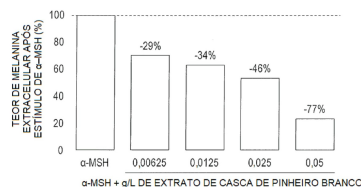
(72) **Inventor(es):** MARIANA ROYER; JOAN ATTIA-VIGNEAU; ESTELLE LOING.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019063183 de 26/11/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/117550 de 11/06/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 28/05/2021

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA DIMINUIR SECREÇÃO DE ENDOTELINA-1, SÍNTESE DE FATOR DE CÉLULA TRONCO OU CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNA EM UM QUERATINÓCITO. Um método para diminuir secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco e/ou carbonilação de proteína em um queratinócito com o uso de um extrato aquoso de casca de Pinus strobus.



## MÉTODO PARA DIMINUIR SECREÇÃO DE ENDOTELINA-1, SÍNTESE DE FATOR DE CÉLULA TRONCO OU CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNA EM UM QUERATINÓCITO

### ANTECEDENTES

[001] Melanogênese, por definição, é a produção dos pigmentos de melanina por células denominadas melanócitos. Melanócitos na pele estão cercados por queratinócitos (um melanócito é cercado por aproximadamente 36 queratinócitos), aos quais transferem seu pigmento de melanina. Melanócitos e queratinócitos interagem entre si extensivamente depois de estímulos extrínsecos (*por exemplo*, radiação ultravioleta (UVR) e fármacos) ou estímulos intrínsecos (*por exemplo*, queratinócitos e fibroblastos, células endócrinas, inflamatórias e neuronais). Em resposta à UVR, queratinócitos produzem diversos fatores, com ação parácrina em melanócitos. Mais especificamente, citocinas derivadas de queratinócito que incluem fator de crescimento de fibroblasto básico, endotelina-1, hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócito ( $\alpha$ -MSH), fator de célula tronco (SCF) e óxido nítrico demonstraram ser reguladas de modo crescente em sua produção e secreção/liberação depois da irradiação UVB e podem atuar como mitógenos e/ou melanógenos para estimular a proliferação e melanogênese de melanócitos humanos.

[002] Proteção UV e atividades de clareamento de pele associadas a um extrato de *Pinus strobus* foram sugeridas (KR 100860604 e U.S. 2010/0129304). No entanto, esses documentos não sugerem nenhum efeito sobre queratinócitos.

### Sumário da Invenção

[003] Esta invenção fornece um método para diminuir secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco e/ou carbonilação de proteína em um queratinócito colocando-se o queratinócito em contato com uma quantidade eficaz de um extrato aquoso de casca de *Pinus strobus*. Em

algumas modalidades, a secreção de endotelina-1 é diminuída em pelo menos 30%; síntese de fator de célula tronco é diminuída em pelo menos 50%; carbonilação de proteína é diminuída em pelo menos 10%. Em determinadas modalidades, o extrato aquoso de casca de *Pinus strobus* inclui 4% de flavonoides, 15% de polifenóis, 0,1% de *trans*-resveratrol e 0,1% de catequina. Em outras modalidades, o extrato aquoso de casca de *P. strobus* está na forma de um creme, pomada, espuma, loção, emplastro, gel, solução ou emulsão.

### **Breve Descrição dos Desenhos**

[004] A Figura 1 mostra que o extrato de casca de *Pinus strobus* modula a síntese de melanina em melanócitos murinos após estímulo de  $\alpha$ -MSH.

[005] A Figura 2 mostra que o extrato de casca de *Pinus strobus* inibe síntese de endotelina-1 em queratinócitos humanos. Cultura celular de queratinócitos sem tratamento (extrato de casca de *pinus*) serviu como o controle. \*\*\* $p < 0,001$ .

[006] A Figura 3 mostra que o extrato de casca de *Pinus strobus* inibe síntese de fator de célula tronco (SCF) em queratinócitos humanos. Cultura celular de queratinócitos sem tratamento (extrato de casca de *pinus*) serviu como o controle. \*\*\* $p < 0,001$ .

[007] A Figura 4 mostra que o extrato de casca de *Pinus strobus* inibe carbonilação de proteína em queratinócitos humanos. HNE (4-hidroxinonenal) foi usado como um ativador de referência de carbonilação de proteína a 20  $\mu$ M. DNPH (2,4-dinitrofenil-hidrazina) foi usado como detector de carbonilação (1  $\mu$ l para 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína). \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

[008] A Figura 5 é um esquema do projeto de protocolo *ex vivo* para demonstrar a inibição de síntese de melanina através do extrato de casca de *Pinus strobus* com o uso de uma epiderme humana reconstruída (RHE).

[009] A Figura 6 mostra que extrato de casca de *Pinus strobus* inibe

pigmentação de pele em um modelo de pele humana *ex vivo*. Cultura *ex vivo* tratada pela fórmula de placebo (fórmula sem o Extrato de Casca de *Pinus*) foi usada como um controle. \*\*p< 0,01, \*\*\*p<0,001.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[0010] Constatou-se, agora, que um extrato aquoso de casca de *Pinus strobus* modula citocinas derivadas de queratinócito envolvidas na proliferação e melanogênese de melanócitos humanos. Em particular, o extrato de casca de *Pinus strobus* diminui a secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco e/ou carbonilação de proteína em queratinócitos. Conseqüentemente, a presente invenção fornece um método para diminuir secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco ou carbonilação de proteína em um queratinócito colocando-se o queratinócito em contato com uma quantidade eficaz de um extrato aquoso de casca de *Pinus strobus*. À luz dessas atividades, o extrato de casca de *Pinus strobus* é de uso na manutenção de homeostase cutânea e modulação de compleição melhorando-se clareamento, opacidade e vermelhidão para fornecer uma pele mais radiante.

[0011] Conforme usado no presente documento, os termos "extrato aquoso de casca de *Pinus strobus*" e "extrato de casca de *Pinus strobus*" são usados intercambiavelmente para se referir ao material que foi extraído da casca de *Pinus strobus* com água. O extrato de casca de *Pinus strobus* desta invenção pode ser obtido moendo-se a casca seca de *Pinus strobus* (normalmente denominada pinheiro branco) em um tamanho de partícula menor que 0,5 mm e submetendo-se o material moído à extração com água quente. A casca moída pode ser extraída com água em uma razão de p/p de 1 parte de material vegetal para 5-20 partes de água, ou mais preferencialmente em uma razão de 1:16. Inicialmente, a água que é adicionada à casca moída está em uma temperatura acima de 70°C, 75°C ou 80°C e está preferencialmente a 85°C. De fato, as temperaturas abaixo de 70°C e acima de 90°C se mostraram impactar negativamente a extração de quercetinas e

kaempferóis de amoreira (Tchabo, *et al.* (2018) *Intern. J. Food Proper.* 21(1):717-732). Adicionalmente, a extração de água de proantocianidinas de casca de *Pinus radiata* mostrou ser significativamente dependente da temperatura, com os valores máximos alcançados em 80°C (Ku, *et al.* (2011) *Forest Prod. J.* 61(4):321-5).

[0012] Idealmente, permite-se que a extração de *Pinus strobus* continue por cerca de 0,5 a 5 horas, preferencialmente cerca de 1 hora, com agitação e sem calor complementar. Uma vez que o material de casca particulado é removido (*por exemplo*, por filtração e/ou centrifugação), o extrato aquoso é seco. Como o método de secagem, secagem por aspersão, liofilização e semelhantes podem ser mencionados sem limitação aos mesmos. Embora o extrato possa ser usado em sua forma seca e incorporado diretamente em uma formulação cosmética, de maneira ideal, o extrato é dissolvido em uma mistura de água e glicerina, *por exemplo*, uma solução de 60-90% de glicerina, ou mais preferencialmente uma solução de 70-80% glicerina. Em particular, 2,5% de extrato (teor sólido) é dissolvido em 20% de água e 77,5% de glicerina.

[0013] A atividade de um extrato de casca de *Pinus strobus* pode ser avaliada com o uso de uma cultura celular de queratócito ou epiderme humana reconstruída, conforme exemplificado no presente documento. Linhagens celulares de queratócitos e epiderme humana reconstruída são bem conhecidas na técnica e estão disponíveis a partir de fontes comerciais. Por exemplo, uma epiderme pigmentada humana reconstruída (RHPE, tipo de pele IV), pode ser obtida a partir da SkinEthic (Lyon, França). Essa RHPE é caracterizada como cultura de queratinócito e melanócito 3D de prepúcio disposta em uma câmara TRANSWELL de 0,4 µM que permite uma interface de ar e líquido.

[0014] De acordo com a presente invenção, um extrato de casca de *Pinus strobus* que exhibe as atividades desejadas de diminuir a secreção de

endotelina-1, síntese de fator de célula tronco e/ou carbonilação de proteína em queratinócitos, é composta por cerca de 4% (e não mais que 8%) de flavonoides, 15% (e não mais que 30%) de polifenóis, 0,1% de *trans-resveratrol* e 0,1% de catequina com base no teor sólido do extrato. A composição química do extrato de casca de *Pinus strobus* pode ser determinada conforme descrito no presente documento ou com o uso de qualquer outra metodologia convencional. Por exemplo, o teor de flavonoide total pode ser avaliado com o uso de um método espectrofotométrico, com base na complexação de cloreto de flavonoide-alumínio ( $AlCl_3$ ) que usa catequina como um composto de referência (Zhishen, *et al.* (1999) *Food Chem.* 64:555-559; da Silva, *et al.* (2015) *Pharmacolgn. Mag.* 11(41):96-101). Quantificação de polifenóis pode empregar métodos colorimétricos, tais como os métodos Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, (1965) *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158) e Prussian-Blue (Budini, *et al.* (1980) *J. Agric. Food Chem.* 28(6):1236-8) para total determinações de polifenol. A estimativa de polifenóis também pode ser realizada, *por exemplo*, através de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de reflexão de infravermelho próximo, cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC), cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa (LC-MS), eletroforese capilar de alto desempenho (HPCE) e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), ou uma combinação das mesmas. Os níveis de *trans-resveratrol* podem ser medidos com o uso de, *por exemplo*, um método de UV-HPLC isocrática de injeção direta (Arslan & Yilmaz (2013) *Asian J. Chem.* 25(3):1225-8) ou electrochemical measurements (Liu, *et al.* (2017) *J. Anal. Methods Chem.* 2017:5749025). A quantidade de catequina presente no extrato pode ser avaliada por UV-HPLC (Raju, *et al.* (2014) *Int. Sch. Res. Notices* 2014:628196), LC-MS/MS ou uma combinação das mesmas (Susanti, *et al.* (2015) *As. Pac. J. Trop. Biomed.* 5(12):1046-50).

[0015] Conforme indicado no presente documento, a invenção

fornece um método para diminuir a secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco e/ou carbonilação de proteína em queratinócitos. O método envolve colocar queratinócitos em contato com um extrato aquoso de casca de *Pinus strobus*, ou opcionalmente uma formulação que contém o mesmo. Idealmente, o extrato é aplicado topicamente na pele para ter o efeito desejado nos queratinócitos. De acordo com o método desta invenção, uma quantidade eficaz do extrato de casca de *Pinus strobus* é fornecida para render uma diminuição mensurável em secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco e/ou carbonilação de proteína pelos queratinócitos. Em modalidades particulares, a secreção de endotelina-1 é diminuída em pelo menos 30%, 40%, 50% ou 60%. Em outras modalidades, a síntese de fator de célula tronco é diminuída em pelo menos 50% ou 60%. Em modalidades adicionais, a carbonilação de proteína é diminuída em pelo menos 10% ou 15%.

[0016] Além dos métodos revelados nos exemplos no presente documento, qualquer método convencional pode ser usado para avaliar os efeitos do extrato de casca de *Pinus strobus* em queratinócitos. Por exemplo, concentrações de endotelina-1 secretada por queratinócitos podem ser medidas com o uso de um radioimunoensaio (Ando, *et al.* (1989) *FEBS Lett.* 245:164-6) ou um imunoensaio ligado à enzima (ELISA; Kurita, *et al.* (2011) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 409(1):103-7). Síntese de fator de célula tronco pode ser medida por análise de western blot ou ELISA (Grabbe, *et al.* (1996) *J. Invest. Dermatol.* 107:219-224). Análise de carbonilação de proteína pode ser realizada por derivatização do grupo carbonila, mais normalmente com di-nitrofenol-hidrazina, e quantificando-se adutos de dinitrofenol-hidrazona (DNP) através de imunoensaio (Alamdari, *et al.* (2005) *Free Rad. Biol. Med.* 39(10):1362-7; Buss & Winterbourn (2002) *Meth. Mol. Biol.* 186:123-8). Métodos espectrofotométricos de massa também podem ser usados para identificação, assim como quantificação relativa de peptídeos carbonilados através de técnicas livres de marcação ou com o uso de

reagentes de derivatização isotopicamente marcados.

[0017] Para facilitar a aplicação do extrato de casca de *Pinus strobus* na pele, a presente invenção também fornece preparações ou formulações que incluem o extrato de casca de *Pinus strobus*. Tais composições podem ser preparadas de várias formas, e são preparadas de maneira desejável em uma forma que facilite aplicação tópica na pele. Consequentemente, formas de preparação adequadas incluem um creme, pomada, espuma, loção, emplastro, gel, solução e emulsão. A frequência de aplicações tópicas de tal composição pode depender de diversos fatores, que incluem o nível desejado de supressão de secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco e/ou carbonilação de proteína. As composições da presente invenção podem ser aplicadas de maneira desejável na pele duas vezes ao dia, e são particularmente aplicadas de maneira desejável uma vez na manhã e uma vez à noite.

[0018] A quantidade de extrato de casca de *Pinus strobus* presente em uma formulação dependerá de diversos fatores, que incluem o nível desejado de atividade, a capacidade de uma preparação particular para um extrato particular e outros fatores. Quando usado como um fluido (*por exemplo*, dissolvido em uma solução de glicerina), o extrato de casca de *Pinus strobus* está entre cerca de 0,01% e cerca de 50% (peso/peso) da composição total. De maneira mais desejável, o extrato de casca de *Pinus strobus* está entre cerca de 0,10 e cerca de 25% (peso/peso) da composição total. De maneira ainda mais desejável, o extrato de casca de *Pinus strobus* está entre cerca de 0,25 e 10% (peso/peso) da composição total. Quando usado como um sólido, o extrato de casca de *Pinus strobus* está entre cerca de 0,001% e 10% (peso/peso) da composição total. De maneira mais desejável, o extrato de casca de *Pinus strobus* está entre cerca de 0,002% e 1% (peso/peso) da composição total. De maneira ainda mais desejável, o extrato de casca de *Pinus strobus* está entre cerca de 0,005 e 0,5% (peso/peso) da

composição total.

[0019] Uma formulação da presente invenção é particularmente bem adequada para aplicação tópica e para uso em pele humana. Conseqüentemente, a presente invenção também inclui o uso cosmético das formulações, de acordo com a presente invenção. Especificamente, a presente invenção inclui o uso cosmético de uma composição que contém um extrato de casca de *Pinus strobus* obtido através de extração com água quente (*isto é, entre 70 e 85°C*) de casca de *Pinus strobus*.

[0020] Uma formulação que contém um extrato de casca de *Pinus strobus* pode ser um fluido viscoso ou semiviscoso, ou um fluido menos viscoso, tal como pode ser usado em aspersões ou aerossóis. A mesma pode assumir a forma de uma solução, suspensão ou emulsão. A mesma pode assumir a forma de um sólido, tal como um pó ou grânulos, que pode ser projetado para ser adicionado ao líquido (*por exemplo, água*) antes do uso. Em algumas modalidades a formulação é, ou pode ser, aplicada em um carreador, tal como uma esponja, esfregão, escova, coxim, tecido, roupa, toalhete, adesivo cutâneo ou curativo (que inclui uma bandagem, emplastro, adesivo de pele ou outro material projetado para aplicação em uma superfície de tecido), para facilitar sua administração.

[0021] Uma formulação de acordo com a invenção pode conter excipientes e outros aditivos conhecidos para uso em formulações tópicas. Excipientes adequados para uso em formulações projetadas para aplicação tópica ou local serão bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Esses incluídos dependerão do modo e local de aplicação destinados para a formulação. No contexto de formulações para aplicação tópica na pele, exemplos podem ser encontrados, por exemplo, em Williams' *Transdermal and Topical Drug Delivery* (Pharmaceutical Press, 2003) e outros livros de referência similares. Consultar também, Date, *et al.* ((2006) *Skin Pharmacol. Physiol.* 19(1):2-16) para uma revisão de estratégias de entrega tópica, e

também *Skin Delivery Systems* ((2006) John J Wille, Ed., Blackwell Publishing.

[0022] Em que a formulação é destinada à aplicação tópica na pele, exemplos de aditivos adequados incluem emolientes, hidratantes, perfumes, antioxidantes, conservantes, estabilizadores, agentes de gelificação e tensoativos; outros podem ser encontrados em Williams' *Transdermal and Topical Drug Delivery* (consultar acima). Quaisquer aditivos adicionais usados nas composições não devem ser irritantes, e não devem afetar negativamente as atividades desejadas de diminuição de secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco e/ou carbonilação de proteína em queratinócitos.

[0023] O extrato de casca de *Pinus strobus* pode ser usado individualmente, ou pode ser usado em combinação com um ou mais ingredientes ativos adicionais, tais como agentes antimicrobianos, agentes anti-inflamatórios, agentes antiacne, queratolíticos, comedolíticos, agentes que têm capacidade para normalizar a função de queratinócito e/ou sebócito, anti-inflamatórios, antiproliferantes, antiandrógenos, agentes seboestáticos/sebossuppressores, antipruríticos, imunomoduladores, anti-irritantes, agentes que promovem cicatrização, bloqueadores solares, agentes de clareamento de pele, substâncias rejuvenescedoras e misturas dos mesmos.

[0024] Uma formulação de uso nos métodos desta invenção pode ser incorporada em e, portanto, aplicada na forma de um cosmético; uma preparação de cuidados com a pele (por exemplo, um limpador de pele, toner ou hidratante); uma preparação de limpeza (por exemplo, uma lavagem ou escova facial); uma preparação cosmeceútica; um produto de higiene (por exemplo, um aditivo para banho ou um sabão). A formulação pode ser, ou ser incorporada em um produto de tratamento de pele de lavagem, tal como um limpador de pele ou, em particular, um produto de pele sem enxágue.

[0025] A invenção é descrita em maiores detalhes pelos seguintes

exemplos sem limitação.

### **Exemplo 1: Extração e Composição Química de Extrato de Casca de *Pinus strobus***

[0026] *Processo de Extração.* O extrato foi preparado com o uso de cascas de *Pinus strobus* exclusivamente residuais da indústria florestal canadense. As cascas foram coletadas, depois secas até um teor de umidificação menor que 10%. Uma vez secas, foram moídas em um primeiro moinho de martelos em 2 mm, então, moídas novamente e examinadas em 0,5 mm. O material de casca homogêneo foi, então, extraído por maceração em água quente depois de um conjunto de parâmetros especificado. Mais especificamente, o material vegetal foi primeiro misturado com a água em uma razão de 1:16 em peso. A mistura foi colocada em 85°C, o calor foi removido e a mistura foi deixada em temperatura por uma hora completa sob agitação. Após a extração ter sido concluída, uma primeira separação dos sólidos e líquidos foi conduzida por meio de um separador de centrífuga contínuo seguido pela remoção dos materiais finos com o uso de um filtro prensa. O extrato claro resultante foi concentrado sob vácuo e baixo calor, e subsequentemente pasteurizado instantaneamente. O extrato concentrado foi colocado sob vácuo e baixo calor por diversas horas para a evaporação completa da água, o que resultou em um pó seco. O pó, que foi considerado um extrato puro, foi subsequentemente dissolvido em uma mistura de água e glicerina sob forte agitação e calor moderado para algumas horas. Essa mistura foi usada em análises subsequentes e preparação de produto final.

[0027] *Composição Química.* O extrato de *Pinus strobus* foi monitorado quanto suas propriedades químicas durante e após sua preparação de modo a avaliar sua qualidade e usabilidade. As propriedades químicas incluíram as quantidades de polifenóis, flavonoides, catequina e *trans-resveratrol*. Essas propriedades foram usadas para assegurar a reprodutibilidade entre lotes e para fornecer uma qualidade quantificável geral

do produto. Como é convencional na técnica, a concentração de teor de flavonoide total foi calculada a partir de uma plotagem de calibragem (5-200 µg/ml de quercetina) e expressa em um equivalente de quercetina. Da mesma forma, o teor fenólico foi calculado como equivalentes de ácido gálico com base em uma curva padrão de ácido gálico (5-500 mg/l). Consultar, *por exemplo*, Chandra, *et al.* (2014) *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, ID do Artigo 253875). Análise de composição química do extrato de *Pinus strobus* indicou que o extraído conteve 4% de flavonoides (equivalentes de quercetina), 15% de polifenóis (equivalentes de ácido gálico), 0,1% de *trans*-resveratrol e 0,1% de catequina.

### **Exemplo 2: Efeito de Extrato de Casca de *Pinus strobus* sobre Síntese de Melanina**

[0028] A pigmentação de pele é o resultado de síntese de melanina pelos melanócitos através de melanogênese. Uma vez sintetizada, a melanina é transferida através dos queratinócitos para uma vesícula chamada melanossoma. A renovação da epiderme levanta, então, o pigmento de melanina para a superfície e a pigmentação de pele aparece. De modo a investigar a atividade fisiológica de extrato de casca de *Pinus strobus* em pigmentação de pele, a capacidade do extrato em reduzir a produção de melanina foi avaliada com o uso de culturas celulares B16-F1.

[0029] Células B16-F1 (uma linhagem celular de melanócitos murinos) foram mantidas em Meio de Eagle Modificado da Dulbecco (DMEM) que contém 10% de soro de bezerro fetal, 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) e 1% de L-glutamina em 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Células B16-F1 foram semeadas em placas de 96 poços em 1,5x10<sup>4</sup> células/poço. Após 24 horas, 20 ng/ml de α-MSH foram adicionados para induzir a melanogênese. Ao mesmo tempo, extrato de casca de *Pinus strobus* (0,00625 g/l, 0,0125 g/l, 0,025 g/l e 0,05 g/l) foi adicionado e a síntese de melanogênese foi medida com base na liberação de melanina no

meio extracelular. A concentração de melanina foi medida com o uso de um espectrofotômetro a 405 nm e os resultados são indicados como percentual de ativação de síntese de melanina por  $\alpha$ -MSH. Todas as condições experimentais foram realizadas em  $n = 3$ . Essa análise indicou que após 4 dias de estímulo de  $\alpha$ -MSH, o extrato de casca de *Pinus strobus* forneceu uma diminuição dependente de dose em síntese de melanina (Figura 1).

### **Exemplo 3: Efeito de Extrato de Casca de *Pinus strobus* sobre Síntese de Endotelina-1**

[0030] Melanogênese é induzida por fatores parácrinos secretados por células endoteliais. Endotelina-1, uma proteína sintetizada por queratinócitos, se liga ao receptor de *endotelina B* (ET<sub>B</sub>) específico em membranas de melanócito e induz a produção de melanina (Imokawa & Ishida (2014) *Int. J. Mol. Sci.* 15:8293-8315). Conseqüentemente, o efeito de extrato de casca de *Pinus strobus* em síntese de endotelina-1 por queratinócitos humanos foi avaliado.

[0031] Queratinócitos *Epidérmicos Humano normais (NHEK)* foram mantidos e cultivados em meio EPILIFE® complementado com CaCl<sub>2</sub> (Life Technologies), a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Células NHEK foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de  $2 \times 10^4$  células/ml por 24 horas. Após 1 dia, o meio foi removido e as células foram tratadas com diferentes concentrações de extrato de casca de *Pinus strobus* (0,0125 g/l, 0,025 g/l e 0,05 g/l) por mais 24 horas. Subseqüentemente, sobrenadantes foram coletados e a liberação de Endotelina-1 de queratinócitos foi determinada com o uso de um ELISA Específico para Tabuleiro de Endotelina (ensaio de imunoabsorção enzimático; R&D Systems, Minneapolis, MN) seguindo o protocolo do fabricante.

[0032] Os resultados são apresentados como a porcentagem de secreção de Endotelina-1 (Figura 2) e indicam que o extrato de casca de *Pinus strobus* exibe uma inibição de síntese de Endotelina-1 dependente de dose.

**Exemplo 4: Efeito de Extrato de Casca de *Pinus strobus* sobre Síntese de Fator de Célula Tronco**

[0033] De maneira similar à Endotelina, o fator de célula tronco (SCF) é induzido por fatores parácrinos e secretado por queratinócitos. SCF se liga ao receptor c-Kit em membranas de melanócito e induz a produção de melanina (dos Santos Videira, *et al.* (2013) *An. Bras. Dermatologie* 88(1):76-83). Consequentemente, o efeito de extrato de casca de *Pinus strobus* em síntese de SCF por queratinócitos humanos foi avaliado.

[0034] Células NHEK foram mantidas e cultivadas em meio EPILIFE® complementado com CaCl<sub>2</sub> (Life Technologies), a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Células NHEK foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 2x10<sup>4</sup> células/ml por 24 horas. Após 1 dia, o meio foi alterado e permitiu-se que as células crescessem por 6 horas. Subsequentemente, as células foram tratadas com diferentes concentrações de extrato de casca de *Pinus strobus* (0,025 g/l e 0,05 g/l) por mais 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados e a liberação de SCF foi determinada com o uso de um Kit de Desenvolvimento de ELISA de SCF Humano (PromoKine) seguindo o protocolo do fabricante.

[0035] Essa análise indicou que em 0,05 g/l o extrato de casca de *Pinus strobus* inibiu a síntese de SCF em 56% (Figura 3).

**Exemplo 4: Efeito de Extrato de Casca de *Pinus strobus* sobre Síntese de Carbonilação de Proteína**

[0036] A carbonilação de proteína é um biomarcador de estresse oxidativo em células dérmicas. Detectada no estrato córneo (SC) exposto ao estresse externo, a carbonilação de proteína induz alteração na capacidade de retenção de água, mas também na propriedade óptica de SC que influencia a transparência da pele (Iwai, *et al.* (2008) *Int. J. Cosmet. Sci.* 30(1):41–46). Adicionalmente, a análise da pele dérmica fotoenvelhecida mostra a correlação entre a cor amarelada e a modificação de carbonila (Ogura, *et al.*

(2011) *J. Dermatol. Sci.* 64(1):45-52). Notavelmente, a carbonilação pode ser detectada e quantificada no nível global em proteínas e misturas de proteínas com o uso de derivatização de grupos carbonila com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) seguido por medições espectrofotométricas ou imunodeteção com anticorpos específicos de DNPH em géis ou em ensaio ELISA (Rogowka-Wrzesinska, *et al.* (2014) *Free Rad. Res.* 48(10):1145-62). Consequentemente, com o uso de DNPH, o efeito de extrato de casca de *Pinus strobus* sobre carbonilação de proteína em queratinócitos humanos foi avaliado.

[0037] Células NHEK foram mantidas e cultivadas em meio EPILIFE® complementado com CaCl<sub>2</sub> (Life Technologies), a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Células NHEK foram semeadas em placas de 6 poços em uma concentração de 3x10<sup>5</sup> células/ml. Em 70-80% de confluência, células são tratadas com extrato de casca de *Pinus strobus* nas diferentes concentrações (0,025 g/l e 0,05 g/l). Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram tratadas com 20 µM de 4-hidroxinonenal (HNE; um ativador conhecido de carbonilação de proteína) por mais 24 horas. No fim da incubação, as células foram enxaguadas, lisadas para extração de proteína e quantificação (Pierce, Thermo Fisher scientific). A carbonilação de proteína foi determinada com o uso de um Kit de Detecção de Oxidação de Proteína Oxyblot™ (Millipore) que inclui DNPH (1 µl de DNPH por 0,5 µg/µl de proteínas). Proteínas derivatizadas de DNP foram detectadas com o uso de um anticorpo primário anti-DNP e um anticorpo secundário conjugado com HRP. A ligação ao anticorpo foi quantificada no software Image J com base na intensidade de quimioluminescência normalizada para a concentração de proteína. Todas as condições experimentais foram realizadas em n = 3.

[0038] Essa análise indicou que o extrato de casca de *Pinus strobus* inibiu significativamente a carbonilação de proteína em pelo menos 11% (Figura 4). À luz desses resultados, o extrato de casca de *Pinus strobus* é para

uso no melhoramento de compleição de pele.

**Exemplo 5: Avaliação de Síntese de Melanina em um Modelo de Pele *Ex vivo***

[0039] Fatores parácrinos secretados por queratinócitos demonstraram ativar receptores de melanogênese específicos em melanócitos, desse modo, se modula a produção de melanina. Para demonstrar que o extrato de casca de *Pinus strobus* inibe a síntese de melanina, o efeito do extrato em uma formulação foi analisado em epiderme reconstruída pigmentada.

[0040] Fotótipo IV de epiderme humana reconstruída (RHE) não pigmentada e RHE pigmentada foram preparados semeando-se melanócitos humanos e queratinócitos em uma câmara de incubação colocada no lado epidérmico de uma derme morta em  $4 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$ , em uma razão de 1:20 de melanócito:queratinócito. Após 24 horas, a câmara de incubação foi removida e a derme morta foi submersa por 3 dias. A derme morta foi movida para a interface de ar e líquido por 8 dias antes do tratamento. Após 8 dias de exposição à interface de ar e líquido, a RHE pigmentada e RHE não pigmentada foram colocadas em contato com o extrato de casca de *Pinus strobus*, placebo, controle negativo (sem tratamento) ou controle positivo (ácido kójico). Isso envolveu aplicação tópica de cada formulação por 3 dias, 2 aplicações por dia (consultar a Figura 5). Após 3 dias, a RHE pigmentada foi incubada por 3 dias na presença de uma mistura de 1:1 de meios frescos e meios condicionados a partir da RHE não pigmentada.

[0041] As formulações incluíram Heliogel™ (copolímero de acrilatos de sódio, poli-isobuteno hidrogenado, fosfolipídios, estearato de poliglicerila-10, óleo de semente de girassol; Lucas Meyer Cosmetics), Saboderm TCC (Triglicerídeo Caprílico/Cáprico; SABO, S.p.A), e Dekaben C (fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno, propilparabeno; Jan Dekker BV) nas quantidades listadas na Tabela 1.

TABELA 1

Ingrediente	Formulação (peso/peso)		
	Placebo	Ácido kójico	Extrato de casca de <i>Pinus strobus</i>
Heliogel™	3%	3%	3%
Saboderm TCC	15%	15%	15%
Água	81,2%	80,2%	79,2%
Dekaben C	0,8%	0,8%	0,8%
Ácido kójico	-	1%	-
Extrato de casca de <i>Pinus strobus</i>	-	-	2%

[0042] Pigmentação foi avaliada por tingimento de Fontana-Masson. As seções de RHE também foram examinadas por microscopia de luz. Como uma região de melanina altamente concentrada cria sinais escuros de alta intensidade, um aumento em luminosidade exibe uma diminuição em teor de melanina.

[0043] Essa análise indicou que o tratamento tópico da RHE pigmentada com extrato de casca de *Pinus strobus* resultou em uma diminuição significativa em síntese de melanina (11,2%), que excedeu aquela fornecida por Ácido Kójico (8,1%) em duas vezes a dose (Figura 6). RHE pigmentada tratada com o sobrenadante de RHE não pigmentada também resultou em uma diminuição significativa em síntese de melanina (7,2%) quando a RHE não pigmentada foi tratada com extrato de casca de *Pinus strobus*. Isso indica que extrato de casca de *Pinus strobus* atua diretamente nos queratinócitos e modula a secreção de moléculas reguladoras necessárias para a melanogênese.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para diminuir secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco ou carbonilação de proteína em um queratinócito caracterizado por compreender colocar um queratinócito em contato com uma quantidade eficaz de um extrato aquoso de casca de *Pinus strobus*, diminuindo, desse modo, a secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco ou carbonilação de proteína no queratinócito.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a secreção de endotelina-1 ser diminuída em pelo menos 30%.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a síntese de fator de célula tronco ser diminuída em pelo menos 50%.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a carbonilação de proteína ser diminuída em pelo menos 10%.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o extrato aquoso de casca de *Pinus strobus* compreender cerca de 4% de flavonoides, 15% de polifenóis, 0,1% de *trans-resveratrol* e 0,1% de catequina.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o extrato aquoso de casca de *Pinus strobus* estar na forma de um creme, pomada, espuma, loção, emplastro, gel, solução ou emulsão.

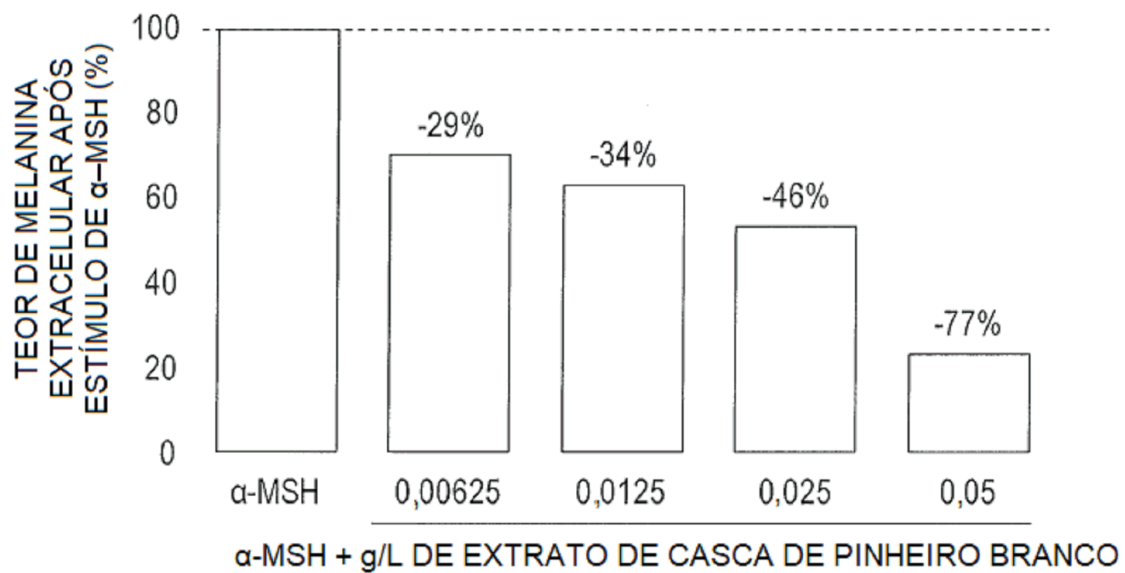


FIG. 1

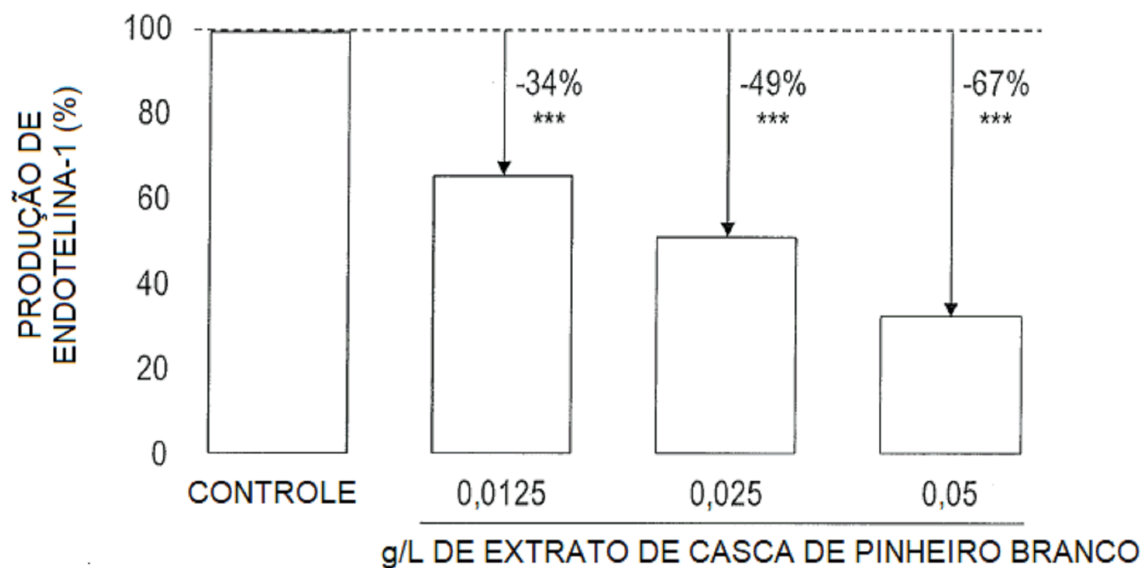


FIG. 2

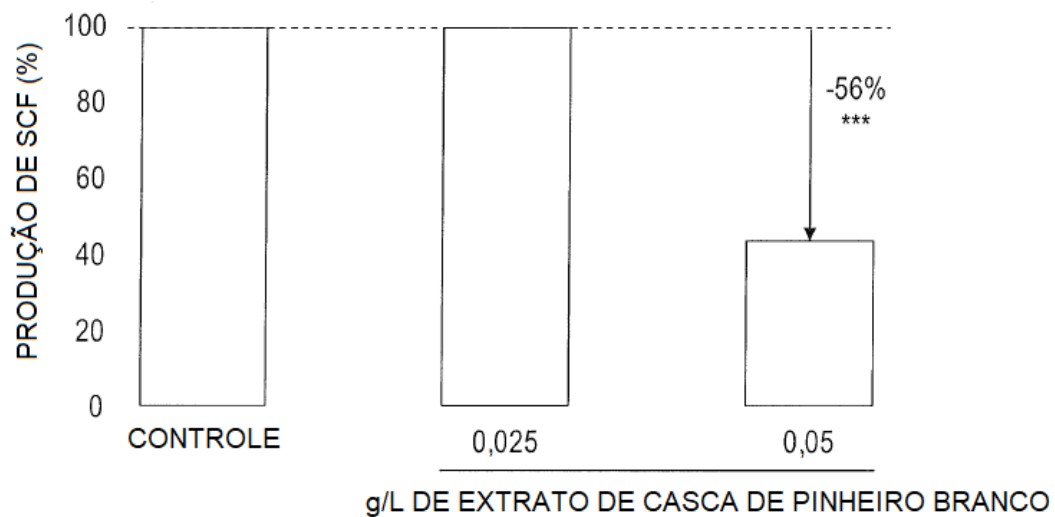


FIG. 3

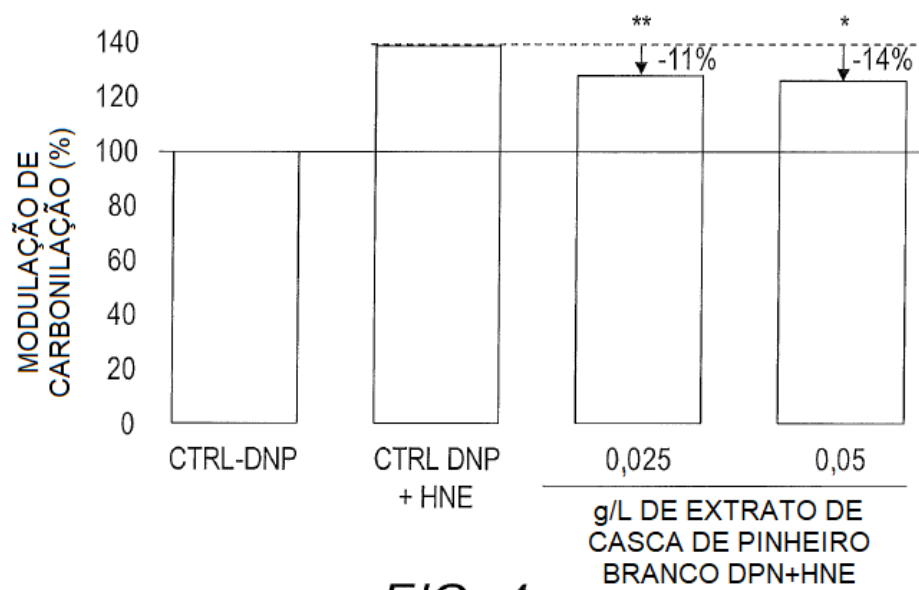


FIG. 4

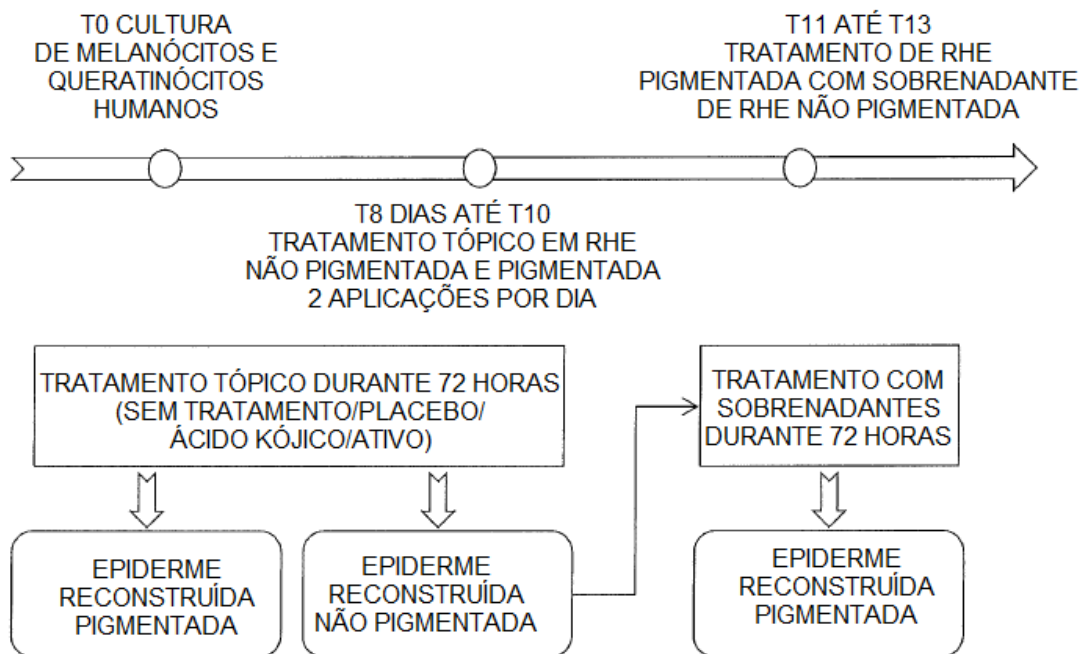


FIG. 5

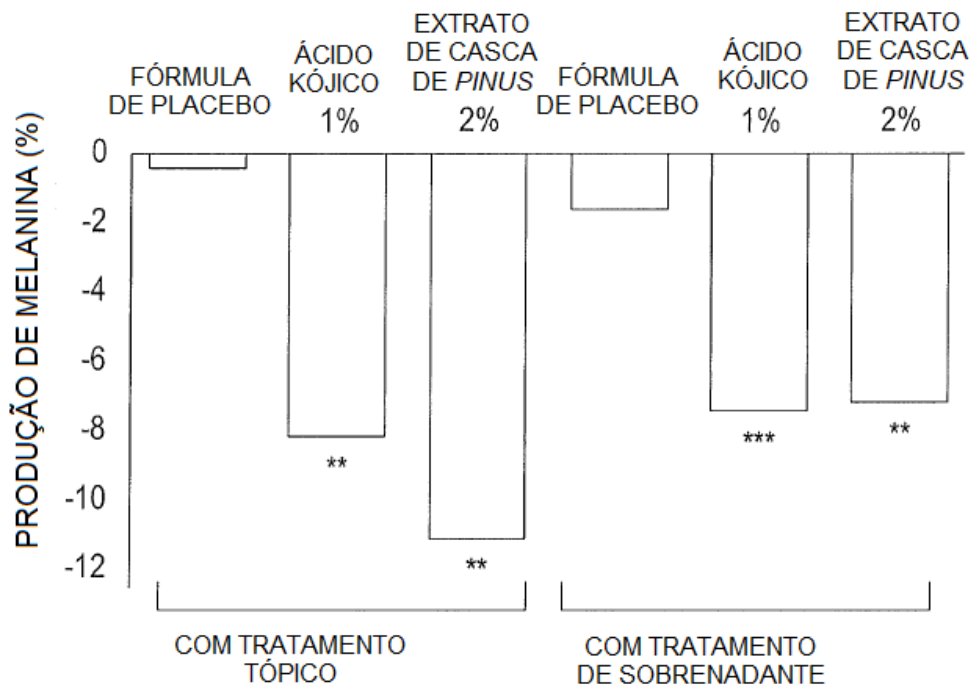


FIG. 6

RESUMO

MÉTODO PARA DIMINUIR SECREÇÃO DE ENDOTELINA-1, SÍNTESE DE FATOR DE CÉLULA TRONCO OU CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNA EM UM QUERATINÓCITO

Um método para diminuir secreção de endotelina-1, síntese de fator de célula tronco e/ou carbonilação de proteína em um queratinócito com o uso de um extrato aquoso de casca de *Pinus strobus*.