

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2009.07.23</b>	(73) Titular(es): <b>L OREAL</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2008.07.29 US 84580 P</b> <b>2008.11.19 FR 0857866</b>	<b>14, RUE ROYALE F-75008 PARIS</b>	<b>FR</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2011.04.13</b>	(72) Inventor(es): <b>ISABELLE CASTIEL</b>	<b>FR</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.09.10</b> <b>241/2014</b>	<b>AUDREY GUENICHE</b>	<b>FR</b>
	(74) Mandatário: <b>NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO</b>	
	<b>RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **USO COSMÉTICO DE LACTOBACILLUS PARACASEI PARA O TRATAMENTO DE PELE OLEOSA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO RELACIONA-SE COM O USO COSMÉTICO DE UMA QUANTIDADE EFICAZ DE PELO MENOS UM MICRORGANISMO PROBIÓTICO E/OU UMA SUA FRAÇÃO E/OU UM SEU METABOLITO, COMO UM AGENTE PARA TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE PELE OLEOSA OU PELE COM UMA TENDÊNCIA OLEOSA E DOS DISTÚRBIOS DE PELE ASSOCIADOS.

## RESUMO

### **"USO COSMÉTICO DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* PARA O TRATAMENTO DE PELE OLEOSA"**

A invenção relaciona-se com o uso cosmético de uma quantidade eficaz de pelo menos um microrganismo probiótico e/ou uma sua fração e/ou um seu metabolito, como um agente para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e dos distúrbios de pele associados.

### DESCRIÇÃO

#### **"USO COSMÉTICO DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* PARA O TRATAMENTO DE PELE OLEOSA"**

A presente invenção relaciona-se com a área de produtos cosméticos e/ou dermatológicos para uso no cuidado de pele oleosa.

Em particular, a presente invenção pretende propor o uso de um novo agente ativo para tratamento e/ou prevenção de distúrbios associados a pele oleosa, em particular através de uma ação onde a secreção de sebo é reduzida.

O sebo constitui normalmente um agente hidratante para a epiderme.

É o produto natural da glândula sebácea que constitui um anexo da unidade filosebácea. É essencialmente uma mistura mais ou menos complexo de lípidos. Convencionalmente, a glândula sebácea produz esqualeno, triglicéridos, ceras alifáticas, ceras de colesterol e, possivelmente, colesterol livre (Stewart, M. E., *Semi Dermatol* 11, 100-105 (1992)). A ação de lipases bacterianas converte uma parte variável dos triglicéridos formados de modo a dar ácidos gordos livres.

O sebócito constitui a célula competente da glândula sebácea. A produção de sebo está associada a um programa de diferenciação terminal desta célula. Durante esta diferenciação, a atividade metabólica do sebócito está essencialmente focada na biossíntese de lípidos (lipogénese) e mais especificamente na neossíntese de ácidos gordos.

A pele oleosa hiperseborreica é caracterizada por secreção e excreção exageradas de sebo. Convencionalmente, um nível de sebo de mais do que  $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  medido na testa é considerado como sendo característico de tal pele oleosa.

Tal pele está também frequentemente associada a um defeito de descamação, uma compleição reluzente e granularidade espessa da pele, manifestações que se sente serem imperfeições da pele ou distúrbios estéticos.

Adicionalmente à sua aparência desagradável à vista constitui um território no qual podem ocorrer complicações. Afeta as áreas onde existem muitas glândulas sebáceas e resulta principalmente de uma sobre-estimulação androgénica da produção sebácea por estas glândulas específicas. Assim sendo, a hiperseborreia contribui para a ocorrência de lesões de acne vulgar.

A acne é uma doença multifatorial que afeta a pele rica em glândulas sebáceas (cara, área dos ombros, braços e áreas intertriginosas). É a forma mais comum de dermatose.

Na sua forma mais suave, esta dermatose afeta quase todos os seres humanos. A sua frequência é máxima durante a puberdade, mas pode manifestar-se pela primeira vez dos 7 aos 9 anos de idade e até idades excedendo 40. Afeta além do mais tanto homens como mulheres.

Entre as suas formas mais comuns, pode ser feita menção a acne comedonal, comumente conhecida como acne juvenil, acne papulopustular e/ou acne nodular, acne conglobata e

acne "exógena" que aparece como uma reação a fatores externos inflamatórios.

Mais especificamente, a acne é uma doença dos folículos das glândulas sebáceas. Os seguintes cinco fatores patogénicos desempenham um papel determinante na formação de acne:

- predisposição genética,
- sobreprodução de sebo (seborreia),
- androgénios,
- distúrbios de queratinização folicular (comedogénese), e
- colonização bacteriana e fatores inflamatórios.

De facto, nas partes mais profundas da porção infundibular do folículo do pelo, é observada a formação de uma quantidade maior do que o normal de queratinócitos. Estas células diferenciam-se para dar células córneas que obstruem gradualmente o lúmen do canal folicular. O processo fisiológico da descamação contínua do acro-infundíbulo na direção da superfície é perturbado pela adesão aumentada das células córneas produzidas. Forma-se um tampão hiperqueratótico, constituindo o comedão, a lesão inicial da acne. Finalmente, os três microrganismos locais predominantes, *Staphylococcus epidermidis*, *Malassezia furfur* e *Propionibacterium acnes*, encontram um ambiente nutritivo ideal no folículo sebáceo. A alteração do ambiente e a melhoria nas condições de crescimento para a microflora levam a um aumento nos produtos pró-inflamatórios tais como lipases, proteases e interleucinas. É aceite que as lipases produzidas dissociam os triglicéridos para dar ácidos gordos livres que, atuando como irritantes para o epitélio folicular, estimulam subsequentemente a hiperproliferação. Os granulócitos são atraídos, intensificando deste modo o

processo inflamatório, e os referidos granulócitos migram para o lúmen do folículo, onde contribuem finalmente para a rutura enzimática da parede do folículo.

As manifestações clínicas, conhecidas como manifestações retencionais, observadas podem ser do tipo comedão aberto ou fechado (microquisto, microcomedão, ponto branco). As lesões inflamatórias derivadas das lesões retencionais podem ser do tipo pápula ou pústula, com nódulos endurecidos, abscessos, fístulas, cicatrizes.

Assim sendo, os indivíduos acneicos e propensos a acne têm o mais comumente pele oleosa, pele com uma tendência oleosa ou pele de combinação. A sua pele é o mais comumente brilhante, com numerosas imperfeições *inter alia* da fase (microquistos, microcomedões, pontos brancos, pápulas, pústulas, com nódulos endurecidos, abscessos, fístulas, cicatrizes). As imperfeições podem ser também do tipo tal como pele sem brilho, esmaecida, discromia, vermelhidão, ou pele áspera com manchas de pele seca. É observada hiperqueratose cutânea, os poros estão dilatados na face, com a pele sendo frequentemente áspera com um estrato córneo espesso, dando a aparência de áreas de pele seca em manchas (atrofia epidérmica e descamação ligeira).

Consequentemente, a hiperseborreia é claramente um fenómeno biológico que parece ser importante controlar eficazmente de modo a prevenir a manifestação de distúrbios de pele associados.

De modo a combater a hiperseborreia, têm sido propostos vários compostos que, quando aplicados topicamente à pele,

são capazes de reduzir a lipogénese nos sebócitos e consequentemente limitar a produção de sebo.

Infelizmente, os tratamentos correntemente disponíveis não são inteiramente satisfatórios, em particular em termos dos efeitos secundários que estão frequentemente associados a eles, tais como efeitos secundários irritantes com certos agentes tópicos tais como retinoides e peróxidos de benzoílo, ou mesmo efeitos secundários gastrointestinais (tratamento com antibiótico oral). Adicionalmente, a resistência de *P. acnes* a certos tratamentos antibacterianos locais é frequentemente observada.

Permanece portanto uma necessidade de ter novos agentes ativos capazes de exercer uma ação cosmética ou terapêutica benéfica em pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa.

Permanece também uma necessidade de ter agentes ativos que tornem possível restabelecer a ecoflora da pele oleosa.

Existe também uma necessidade de ter novas composições que sejam eficazes para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e que sejam agradáveis e confortáveis de usar, promovendo assim cumprimento do tratamento.

Existe também uma necessidade de ter novos agentes ativos que tornem possível tratar e/ou prevenir distúrbios de pele oleosa, especialmente tais como dermatite seborreica e, em particular, acne.

O objetivo da presente invenção é atender a estas necessidades.

Assim sendo, de acordo com um primeiro assunto, a invenção relaciona-se com o uso cosmético oral de uma quantidade eficaz do microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei* como um agente ativo para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e dos distúrbios associados.

Os inventores notaram, de facto, que se descobriu que um tal microrganismo é eficaz para o tratamento e/ou prevenção de distúrbios associados a pele oleosa e/ou pele com uma tendência oleosa.

Para o propósito da presente invenção, o termo "pele" destina-se a significar a pele da face ou do corpo.

Para o propósito da presente invenção, o termo "quantidade eficaz" destina-se a significar uma quantidade suficiente para obter o efeito esperado.

Para o propósito da presente invenção, o termo "prevenir" destina-se a significar o facto de redução do risco da ocorrência da manifestação do distúrbio sob consideração.

Para conhecimento dos inventores, esta eficácia do microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei* nunca foi descrita.

O uso de microrganismos, em particular microrganismos probióticos, para cuidado da pele foi já descrito.

Assim sendo, o documento WO 2006/07922 descreve composições dedicadas ao tratamento de pele sensível, usando, como



agente ativo, uma combinação de um microrganismo *Lactobacillus paracasei* ou *casei* e de um microrganismo *Bifidobacterium longum* ou *Bifidobacterium lactis*.

FR 2 872 047 descreve, por seu lado, uma combinação de um microrganismo probiótico com um catião inorgânico divalente.

Quanto a FR 2 889 057, divulga uma composição tópica compreendendo um microrganismo probiótico em combinação com um ácido gordo polinsaturado e/ou éster de ácido gordo polinsaturado, que é de uso no tratamento da pele sensível.

Adicionalmente, WO 02/28402 descreve o uso de microrganismos probióticos para regulação de reações de hipersensibilidade da pele, tais como reações inflamatórias e alérgicas.

Finalmente, WO 03/070260 relaciona-se com o uso de microrganismos probióticos para os propósitos da fotoproteção da pele.

Consequentemente, nenhum destes documentos descreve o uso oral de *Lactobacillus paracasei*, e em particular da estirpe ST11 de *Lactobacillus paracasei* como um agente ativo que é de uso no tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e distúrbios da pele associados por rota oral.

Um assunto da invenção é também o uso cosmético oral de uma quantidade eficaz de *Lactobacillus paracasei* e em particular da estirpe ST11 de *Lactobacillus paracasei* como um agente ativo para tratamento e/ou prevenção de dermatose

seborreica associada a pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa.

A presente invenção está também dirigida para o uso cosmético oral do microrganismo acima mencionado, como um agente ativo para tratamento e/ou prevenção das lesões e/ou imperfeições da pele oleosa e/ou pele com uma tendência oleosa, e em particular as lesões retencionais do tipo comedão aberto ou fechado (microquistos, microcomedões, pontos brancos) e/ou as imperfeições do tipo tal como pele sem brilho, reluzente ou esmaecida, discromia, vermelhidão, ou pele áspera, com, como apropriado, manchas de pele seca.

De acordo com uma forma de realização particular, um assunto da invenção é o uso oral do microrganismo acima mencionado, para a preparação de uma composição, em particular uma composição dermatológica, para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e dos distúrbios associados, tais como, por exemplo, dermatose, especialmente do tipo seborreico, e em particular acne.

A invenção está em particular dirigida para o uso oral de um tal microrganismo para a preparação de uma composição, em particular uma composição dermatológica, para uso no tratamento ou prevenção de acne, e em particular da acne comedonal, papulopustular e/ou nodular, acne conglobata e acne exógena.

Tais formas de dermatose podem ser o resultado de uma condição benigna causada pela proliferação excessiva de um fungo e/ou de levedura e em particular de levedura do género *Malassezia*.

Agora, como emerge a partir dos dados apresentados nos exemplos, os inventores caracterizaram em particular a capacidade de um microrganismo de acordo com a presente invenção de estimular a síntese de um número surpreendente de proteína capazes de promover e reforçar as defesas antimicrobianas da epiderme.

Em particular, os inventores demonstraram que um microrganismo do género *Lactobacillus paracasei* de acordo com a invenção torna possível estimular a síntese de um número surpreendente de proteína capazes de promover e reforçar as defesas antimicrobianas da epiderme.

Em particular, os inventores demonstraram que um tal microrganismo torna possível estimular a expressão de várias proteínas de defesa antimicrobiana da epiderme, tais como ribonuclease 7 (No. de Acesso Uniref Q9H1E1), dermcidina (P81605), "proteína induzível por prolactina" (P12273), as proteínas S100 A8 e A9 (P05109 e P06702), e a proteína histona (Q5R2W0), capazes de reforçar as defesas da epiderme contra colonização excessiva por microrganismos patogénicos.

Agora, esta estimulação das proteínas acima mencionadas tem a vantagem de se opor eficazmente a uma colonização da epiderme pelos microrganismos *Malassezia furfur* e *Propionibacterium acnes*, responsáveis pelos distúrbios de pele associados a pele oleosa e/ou pele com uma tendência oleosa. Esta diminuição obtida por meio do referido microrganismo de acordo com a invenção contribui portanto para o restabelecimento de uma ecoflora equilibrada com, como consequência, uma diminuição nas condições

inflamatórias da pele e regulação da seborreia. Como resultado, as imperfeições são reduzidas, a compleição torna-se mais reluzente e mais homogênea, sem áreas de discromia, ou de secura.

Um tratamento de acordo com a invenção pode provar ser tanto mais eficaz na acne e nas imperfeições da face se o referido microrganismo combinar, com as suas propriedades de estimulação dos mecanismos de defesa epidérmicos, propriedades de estimulação da síntese de proteases envolvidas nos fenómenos de descamação KLK7 (Ref. P49862), KLK5 (Q9Y337), catepsina L2 (060911) como atestado pelo aumento nos fragmentos das proteínas dos corneodesmosomas DSG1 (Q02413), DSC1a (Q9HB01), Cdsn (Q15517), induzidas pelo microrganismo usado de acordo com a presente invenção. O tampão de queratina do comedão pode, parece, ser depois rapidamente eliminado através da ação destas enzimas proteolíticas, prevenindo a criação de um ambiente fechado adequado para desenvolvimento bacteriano e subsequente inflamação.

A presente invenção está também dirigida para o uso oral de um microrganismo de acordo com a invenção, para a preparação de uma composição, em particular uma composição dermatológica, para regulação da seborreia.

A presente invenção está também dirigida para o uso cosmético oral de uma quantidade eficaz de *Lactobacillus paracasei* e, em particular, da estirpe ST11 de *Lactobacillus paracasei* como um agente ativo para manutenção e/ou restauração da homeostase da pele.

Um uso de acordo com a invenção pode também compreender o uso de *Lactobacillus paracasei* como primeiro microrganismo probiótico e, em particular, da estirpe ST11 de *Lactobacillus paracasei* em combinação com uma quantidade eficaz de pelo menos um segundo microrganismo, auxiliar, em particular um microrganismo probiótico, distinto do primeiro microrganismo por rota oral.

Um uso de acordo com a presente invenção pode também compreender o uso do microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei* e, em particular, da estirpe ST11 de *Lactobacillus paracasei*, em combinação com uma quantidade eficaz de pelo menos um agente ativo para diminuição e/ou correção da secreção excessiva do sebo, por exemplo um agente ativo antisseborreico, em particular como descrito doravante.

De acordo com outro dos seus aspetos, a presente invenção relaciona-se com uma composição cosmética e/ou composição dermatológica que é de uso oral para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e dos distúrbios estéticos associados, compreendendo, num transportador fisiologicamente aceitável, no microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei* e em particular da estirpe ST11 de *Lactobacillus paracasei* em combinação com uma quantidade eficaz de pelo menos um agente ativo antisseborreico, em particular como descrito doravante.

De acordo com outro dos seus aspetos, o assunto da invenção é um método, em particular um método cosmético, para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e os distúrbios associados, em particular distúrbios estéticos, num indivíduo, compreendendo pelo

menos um passo de administração oral, ao referido indivíduo, do microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei* e, em particular, da estirpe ST11 de *Lactobacillus paracasei*.

O microrganismo de acordo com a invenção é usado oralmente.

A administração oral tem a vantagem de atuar globalmente na pele inteira, nas suas camadas profundas (derme, hipoderme), por meio de um modo de administração rápido e relativamente não restritivo. Especificamente, os metabolitos e outros nutrimentos ativos são em particular distribuídos dentro da matriz dérmica por meio da corrente sanguínea.

A administração oral tem também a vantagem de um modo de administração rápido e relativamente não restritivo.

O uso cosmético de acordo com a invenção é levado a cabo oralmente e o método de acordo com a invenção compreende a administração oral da referida quantidade eficaz do microrganismo sob consideração de acordo com a invenção.

Como especificado doravante, as composições contendo o referido microrganismo são formuladas de modo a serem compatíveis com o modo de administração oral.

### **Microrganismos**

O microrganismo adequado para a invenção é o microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei*.

Para os propósitos da presente invenção, o termo "microrganismo probiótico" destina-se a significar um

microrganismo vivo que, quando é consumido em quantidade apropriada, tem um efeito positivo na saúde do seu hospedeiro ("Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotic in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria", 6 de outubro de 2001), e que possa em particular melhorar o equilíbrio microbiano intestinal.

De acordo com uma variante da invenção, este microrganismo é usado numa forma isolada, *i.e.*, não misturado com um ou mais composto(s) que podem estar associados ao referido microrganismo no seu ambiente de origem.

O microrganismo adequado para a invenção é *Lactobacillus paracasei*, depositado de acordo com o Tratado de Budapeste com o Instituto Pasteur (28 rue du Docteur Roux, F-75024 Paris cedex 15) em 12/01/99 sob a seguinte designação: CNCM I-2116.

O microrganismo probiótico adequado para a invenção é *Lactobacillus paracasei*.

Um microrganismo adequado para a invenção pode ser em particular a estirpe ST11 de *Lactobacillus paracasei* depositada de acordo com o Tratado de Budapeste com o Instituto Pasteur (28 rue du Docteur Roux, F-75024 Paris cedex 15) em 12/01/99 sob a designação CNCM I-2116.

De acordo com uma forma de realização variante, a invenção relaciona-se com o uso oral, adicionalmente ao primeiro microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei*, de pelo menos uma quantidade eficaz de pelo menos um segundo

microrganismo, em particular do tipo probiótico distinto do referido primeiro microrganismo.

Este segundo microrganismo pode ser escolhido em particular de ascomicetos tais como *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Aspergillus* e *Penicillium*, bactérias do género *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostrepococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*, e suas misturas.

Como ascomicetos o mais particularmente adequados para a presente invenção, pode ser feita menção em particular de *Yarrowia lipolitica* e *Kluyveromyces lactis*, e do mesmo modo *Saccharomyces cereviseae*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida* e *Pichia*.

Exemplos específicos de microrganismos probióticos são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbruckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus GG*), *Lactobacillus sake*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, e suas misturas.

De acordo com uma forma de realização, os seguintes géneros bacterianos e de levedura são preferencialmente usados como segundo microrganismo:



- bactérias do ácido láctico, que produzem ácido láctico por fermentação de açúcar. Dependendo da sua morfologia, são divididas em dois grupos:

espécies de *Lactobacillus*: *Lactobacillus acidophilus*, *amylovorus*, *casei*, *rhamnosus*, *brevis*, *crispatus*, *delbrueckii* (subsp. *bulgaricus*, *lactis*), *fermentum*, *helveticus*, *gallinarum*, *gasseri*, *johnsonii*, *plantarum*, *reuteri*, *salivarius*, *alimentarius*, *curvatus*, *casei* subsp. *casei*, *sake*, e

Gocci: *Enterococcus* (*faecalis*, *faecium*), *Lactococcus lactis* (subsp. *lactis* ou *cremoris*), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Streptococcus salvarius* subsp. *thermophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*,

- bifidobactérias ou espécies de *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve*, *lactis*, *longum*, *infantis*, *pseudocatenulatum*,
- levedura: *Saccharomyces* (*cerevisiae* ou então *boulardii*),
- as outras espécies esporuladas: *Bacillus* (*cereus* var. *toyo* ou *subtilis*), *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, estirpe nissle de *Escherichia coli*, *Propionibacterium freudenreichii*,
- e suas misturas.

As espécies o mais particularmente adequadas são *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium lactis* NCC 2818, respetivamente depositadas de acordo com o Tratado de Budapeste com o Instituto Pasteur (28 rue du Docteur Roux,

F-75024 Paris cedex 15) em 30/06/92, 12/01/99, 15/04/99, 15/04/99 e 07/06/05 sob as seguintes designações: CNCM I-1225, CNCM I-2168, CNCM I-2170 e CNCM 1-3446, e o género *Bifidobacterium longum* (BB536), e suas misturas.

De acordo com uma forma de realização particular, o microrganismo probiótico é do género *Lactobacillus species*, em particular da espécie *Lactobacillus johnsonii*.

Pode ser em particular a espécie *Lactobacillus johnsonii* respetivamente depositada de acordo com o Tratado de Budapeste com o Instituto Pasteur (28 rue du Docteur Roux, F-75024 Paris cedex 15) em 30/06/92, sob a designação CNCM I-1225.

O microrganismo usado na invenção pode ser formulado numa composição numa proporção de pelo menos 0,0001% (expresso como peso seco), em particular numa proporção de 0,0001% a 20%, e mais particularmente numa proporção de 0,001% a 15% por peso, em particular de 0,01% a 10% por peso, e especialmente de 0,1% a 2% por peso, em relação ao peso total da composição.

Em geral, a composição oral usado de acordo com a invenção pode compreender, para microrganismos vivos, de  $10^3$  a  $10^{15}$  cfu/g, em particular de  $10^5$  a  $10^{15}$  cfu/g, e mais particularmente de  $10^7$  a  $10^{12}$  cfu/g de microrganismos por grama de transportador, ou a doses equivalentes calculadas para microrganismos inativos ou mortos ou para frações de microrganismo ou para metabolitos produzidos.

Nas composições orais usadas, a concentração de cada microrganismo e/ou fração e/ou metabolito correspondentes

pode ser ajustada de modo a corresponder a doses (expressas como equivalente de microrganismo) variando de  $5 \times 10^5$  a  $10^{13}$  cfu/d, e em particular de  $10^8$  a  $10^{11}$  cfu/d.

O(s) microrganismo(s) pode(m) ser incluído(s) numa composição de acordo com a invenção numa forma viva, semiativa, inativada, ou morta.

De acordo com uma forma de realização particular, estes microrganismos são usados numa forma viva.

De acordo com uma variante, as composições podem também conter um catião inorgânico divalente.

As composições de acordo com a invenção podem estar em qualquer uma das formas galénicas usualmente disponíveis para o método de administração selecionado.

#### **AGENTE ATIVO AUXILIAR**

O microrganismo usado na invenção pode ser vantajosamente combinado com pelo menos um outro agente ativo.

Assim sendo, uma composição oral usada de acordo com a invenção pode também conter pelo menos um agente ativo antisseborreico.

Uma tal formulação pode vantajosamente ampliar os efeitos benéficos de um microrganismo da invenção.

O termo "agente ativo antisseborreico" destina-se a significar um composto capaz de regular a atividade das glândulas sebáceas.

Um agente ativo antisseborreico adequado para a invenção pode ser em particular escolhido de ácido retinoico, peróxido de benzoílo, enxofre, vitamina B6 (ou piridoxina), cloreto de selénio, funcho-marítimo; misturas de extrato de canela, de chá e de octanoílglicina, tais como Sepicontrol A5 TEA® da Seppic; a mistura de canela, sarcosina e octanoílglicina vendida em particular pela empresa SEPPIC sob o nome comercial Sepicontrol A5®; sais de zinco tais como gluconato de zinco, pirrolidonacarboxilato de zinco (ou pidolato de zinco), lactato de zinco, aspartato de zinco, carboxilato de zinco, salicilato de zinco, cisteato de zinco; derivados de cobre, e em particular pidolato de cobre tal como Cuivridone® da Solabia; extratos de plantas das espécies *Arnica montana*, *Cinchona succirubra*, *Eugenia caryophyllata*, *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris*, todos vendidos, por exemplo, pela empresa Maruzen; extratos de rainha-dos-prados (*Spiraea ulmaria*) tais como o produto vendido sob o nome Sebonormine® pela empresa Silab; extratos da alga *Laminaria saccharina* tais como o produto vendido sob o nome Phlorogine® pela empresa Biotechmarine; misturas de extratos de raiz de pimpinela (*Sanguisorba officinalis*/*Poterium officinale*), de rizomas de gengibre (*Zingiber officinalis*) e de casca de canela (*Cinnamomum cassia*), tais como o produto vendido sob o nome Sebestop® pela empresa Solabia; extratos de linhaça, tais como o produto vendido sob o nome Linumine® pela empresa Lucas Meyer; extratos de *Phellodendron*, tais como aqueles vendidos sob o nome Phellodendron extract BG® pela empresa Maruzen ou Oubaku liquid B pela empresa Ichimaru Pharcos; misturas de óleo de argão, de extrato de *Serenoa serrulata* (palmeto em pó) e de extrato de semente de sésamo, tais

como o produto vendido sob o nome Regu SEB<sup>®</sup> pela empresa Pentapharm; misturas de extratos de erva-salgueira, de *Terminalia chebula*, de nastúrcio e de zinco biodisponível (microalgas), tais como o produto vendido sob o nome Seborilys<sup>®</sup> pela empresa Green Tech; extratos de *Pygeum africanum*, tais como o produto vendido sob o nome Pygeum africanum sterolic lipid extract<sup>®</sup> pela empresa Euromed; extratos de *Serenoa serrulata*, tais como aqueles vendidos sob o nome Viapure Sabal<sup>®</sup> pela empresa Actives International, ou aquelas vendidas pela empresa Euromed; misturas de extratos de banana-mão, de *Berberis aquifolium* e de salicilato de sódio, tais como o produto vendido sob o nome Seboclear<sup>®</sup> pela empresa Rahn; extrato de cravo-da-índia, tal como o produto vendido sob o nome Clove extract Powder<sup>®</sup> pela empresa Maruzen; óleo de argão, tal como o produto vendido sob o nome Lipofructyl<sup>®</sup> pelos Laboratoires Serobiologiques; filtrados de proteína láctica, tais como o produto vendido sob o nome Normaseb<sup>®</sup> pela empresa Sederma; extratos da alga *Laminaria*, tais como o produto vendido sob o nome Laminarghane<sup>®</sup> pela empresa Biotechmarine; oligossacarídeos da alga *Laminaria digitata*, tais como o produto vendido sob o nome Phycosaccharide AC<sup>®</sup> pela empresa Codif; extratos de cana-de-açúcar, tais como o produto vendido sob o nome Policosanol<sup>®</sup> pela empresa Sabinsa; óleo de xisto sulfonado, tal como o produto vendido sob o nome Ichthyol Pale<sup>®</sup> pela empresa Ichthyol; extratos de rainha-dos-prados (*Spiraea ulmaria*) europeia, tais como o produto vendido sob o nome Cytobiol<sup>®</sup> Ulmaire pela empresa Libiol; ácido sebácico, em particular vendido na forma de um gel de poliacrilato de sódio sob o nome Sebosoft<sup>®</sup> pela empresa Sederma; glucomananos extraídos de tubérculo de *konjac* e modificados com cadeias de alquilsulfonato, tais como o produto vendido sob o nome Biopol Beta<sup>®</sup> pela empresa Arch

Chemical; extratos de *Sophora angustifolia*, tais como aqueles vendidos sob o nome Sophora powder<sup>®</sup> ou Sophora extract<sup>®</sup> pela empresa Bioland; extratos de casca de *Cinchona succirubra*, tais como o produto vendido sob o nome Red bark HS<sup>®</sup> pela empresa Alban Muller; extratos de *Quillaja saponaria*, tais como o produto vendido sob o nome Panama wood HS<sup>®</sup> pela empresa Alban Muller; glicina enxertada numa cadeia undecilénica, tal como o produto vendido sob o nome Lipacide UG OR<sup>®</sup> pela empresa Seppic; a mistura de ácido oleanólico e de ácido nordiidroguaiarética, tal como o produto vendido na forma de um gel sob o nome AC.Net<sup>®</sup> pela empresa Sederma; ácido ftalimidoperoxihexanoico; citrato de trialquilo(C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>) vendido sob o nome Cosmacol<sup>®</sup> ECI pela empresa Sasol; citrato de trialquilo(C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>) vendido sob o nome Cosmacol<sup>®</sup> ECL pela empresa Sasol; ácido 10-hidroxidecanoico, e em particular misturas de ácido 10-hidroxidecanoico, de ácido sebácico e de 1,10-decanodiol, tais como o produto vendido sob o nome Acnacidol<sup>®</sup> BG pela empresa Vincience; e suas misturas.

O agente ativo antisseboreico está, por exemplo, presente num conteúdo variando de 0,1% a 10% por peso, preferencialmente de 0,1% a 5% por peso, e preferencialmente de 0,5% a 3% por peso, em relação ao peso total da composição.

Adicionalmente a este agente ativo antisseboreico, as composições usadas de acordo com a invenção podem também conter outros agentes ativos comumente usados e/ou permitidos.

Como agentes ativos que são convencionalmente usados, pode ser feita menção de vitaminas B3, B5, B6, B8, C, D, E, ou PP, niacina, carotenoides, polifenóis, minerais e elementos vestigiais, fitoestrogénios, proteínas e aminoácidos, monossacarídeos e polissacarídeos, aminoaçúcares, fitoesteróis e álcoois triterpénicos de origem vegetal.

Os minerais e elementos vestigiais particularmente usados são zinco, cálcio, magnésio, cobre, ferro, iodo, manganês, selénio, e crómio (III).

Entre os polifenóis, são também em particular selecionados polifenóis de uva, de chá, de azeitona, de cacau, de café, de maçã, de mirtilo, de sabugueiro, de morango, de arando e de cebola. Preferencialmente, entre os fitoestrogénios, são selecionadas isoflavonas em forma livre ou glicosilada, tais como genisteína, daidzeína, gliciteína ou então lignanos, em particular aquelas de linho ou *Schizandra chinensis*.

Os aminoácidos ou os péptidos e as proteínas contendo-os, tais como taurina, treonina, cisteína, triptofano, ou metionina. Os lípidos pertencem preferencialmente ao grupo de óleos contendo ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados tais como ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linoleico, ácido gama-linoleico, ácido estearidónico, ácidos gordos ómega 3 de cadeia longa do peixe, tais como EPA e DHA, ou ácidos gordos conjugados derivados de plantas ou de animais, tais como CLAs (ácidos linoleicos conjugados).

Em particular, pode ser feito uso de um complexo antioxidante compreendendo vitaminas C e E, e pelo menos um

carotenoide, em particular um carotenoide escolhido de  $\beta$ -caroteno, licopeno, astaxantina, zeaxantina e luteína, flavonoides, tais como catequinas, hesperidina, proantocianidinas e anticianinas, ácido lipoico e coenzima Q10.

O agente ativo auxiliar pode ser também pelo menos um pré-biótico ou uma mistura de pré-bióticos. Mais particularmente, estes pré-bióticos podem ser escolhidos de oligossacarídeos, produzidos a partir de glucose, galactose, xilose, maltose, sacarose, lactose, amido, xilano, hemicelulose ou inulina, gomas do tipo acácia por exemplo, ou uma sua mistura.

Mais particularmente, o oligossacarídeo compreende pelo menos um frutooligossacarídeo. Mais particularmente, este pré-biótico pode compreender uma mistura de frutooligossacarídeo e inulina.

No que diz respeito aos agentes ativos lipofílicos, pode ser feito uso de retinol (vitamina A) e seus derivados, tocoferol (vitamina E) e seus derivados, ceramidas, óleos essenciais e materiais insaponificáveis (tocotrienol, sesamina, gama-orizanol, fitoesteróis, esqualenos, ceras e terpenos).

É possível combinar vantajosamente, com o produto, agentes ativos para promover a descamação, tais como os agentes ativos hidratantes de referência em cosmética: glicerol, ácido hialurónico, ureia e seus derivados, e também agentes ativos para promover a descamação e exfoliação, tais como agentes quelantes, ácido jasmónico e seus derivados, em particular ER2412, compostos redutores, derivados



sulfônicos e em particular Hepes, aminoácidos, AHA e BHA, o mais particularmente ácido glicólico e ER195, e certos detergentes.

### **Formas galénicas**

As composições de acordo com a invenção podem estar em qualquer uma das formas galénicas normalmente disponíveis para o método de administração oral.

O transportador pode ser de natureza diversa dependendo do tipo de composição sob consideração.

No caso do uso de acordo com a invenção por administração oral, é preferencial o uso de um transportador ingerível.

O transportador ingerível pode ser de natureza diversa dependendo do tipo de composição sob consideração.

Comprimidos ou pastilhas, suplementos orais em forma seca e suplementos orais em forma líquida são assim adequados em particular para uso como transportadores farmacêuticos ou alimentares.

Podem, por exemplo, ser suplementos alimentares, a formulação dos quais pode ser realizada através dos processos usuais para produção em particular de comprimidos revestidos por açúcar, cápsulas de gel, géis, emulsões, comprimidos, cápsulas e hidrogéis permitindo libertação controlada.

Em particular, o microrganismo de acordo com a invenção pode ser incorporado em qualquer outra forma de suplemento alimentar ou alimento enriquecido, por exemplo barras

alimentares ou pós compactados ou não compactados. Os pós podem ser diluídos em água, carbonato de sódio, produtos lácteos ou derivados de soja, ou ser incorporados em barras alimentares.

O microrganismo usado, de acordo com a invenção, pode, além do mais, ser formulado com os excipientes e componentes que são habituais para tais composições orais ou suplementos alimentares, *i.e.*, em particular, componentes gordos e/ou aquosos, humidificantes, espessantes, conservantes, agentes texturantes, intensificadores do aroma e/ou agentes de revestimento, antioxidantes, conservantes e corantes que são habituais no setor alimentar.

Os agentes de formulação e excipientes para composições orais, e em particular para suplementos alimentares, são conhecidos nesta área e não serão sujeitos a uma descrição detalhada aqui.

Leite, iogurte, queijo, leites fermentados, produtos fermentados à base de leite, gelos, produtos à base de cereais ou produtos à base de cereais fermentados, pós à base de leite, fórmula de crianças e bebês, produtos alimentares de confeitaria, do tipo chocolate ou cereal, ração animal, em particular para animais domésticos, comprimidos, cápsulas de gel ou pastilhas, suspensões bacterianas líquidas, suplementos orais em forma seca e suplementos orais em forma líquida são especialmente adequadas como transportadores farmacêuticos ou alimentares.

Um microrganismo usado de acordo com a invenção pode, além do mais, ser formulado com os excipientes e componentes que

são habituais para tais composições orais ou suplementos alimentares, *i.e.*, em particular, componentes gordos e/ou aquosos, humidificantes, espessantes, conservantes, agentes texturantes, intensificadores do aroma e/ou agentes de revestimento, antioxidantes, conservantes e corantes que são habituais no setor alimentar.

Os agentes de formulação e excipientes para composições orais, e em particular para suplementos alimentares, são conhecidos nesta área e não serão sujeitos a uma descrição detalhada aqui. Muitas formas de realização de composições orais e em particular de suplementos alimentares são possíveis para ingestão. A sua formulação é levada a cabo por meio dos métodos usuais para produção de comprimidos revestidos por açúcar, cápsulas de gel, géis, hidrogéis para libertação controlada, emulsões, comprimidos ou cápsulas.

De acordo com uma forma de realização particular, os microrganismos auxiliares sob consideração de acordo com a invenção podem ser formulados em composições numa forma encapsulada de modo a melhorar significativamente o seu tempo de sobrevivência. Num tal caso, a presença de uma cápsula em particular pode atrasar ou prevenir a degradação do microrganismo no trato gastrointestinal.

O método de tratamento cosmético da invenção é levado a cabo por administração oral de pelo menos uma quantidade eficaz de pelo menos um microrganismo de acordo com a invenção.

A administração oral compreende ingestão, numa ou em mais tomas, de uma composição oral como definido acima.

Na descrição e nos exemplos que se seguem, a não ser que indicado de outro modo, as percentagens são percentagens por peso e as gamas de valores escritas na forma "entre...e..." incluem os limites superiores e inferiores especificados. Os ingredientes são misturados, antes de serem formulados, na ordem e sob condições prontamente determinadas por aqueles peritos na técnica.

De acordo com uma variante, o método cosmético compreende pelo menos um passo de administração oral de uma quantidade eficaz de pelo menos um microrganismo de acordo com a invenção e pelo menos um passo de administração tópica de uma quantidade eficaz de pelo menos um microrganismo de acordo com a invenção.

O método de acordo com a invenção pode compreender uma única administração.

De acordo com outra forma de realização, a administração é repetida, por exemplo, 2 a 3 vezes por dia, durante um dia ou mais e geralmente durante um período sustentado de pelo menos 4 semanas, ou mesmo 4 a 15 semanas, com, onde apropriado, um ou mais períodos de interrupção.

Os ingredientes são misturados, antes de serem formulados, na ordem e sob condições prontamente determinadas por aqueles peritos na técnica.

Nestes exemplos, o termo "cfu" denota "unidade formadora de colónias". Esta é a unidade de medida usada para quantificar bactérias vivas.

A *Lactobacillus paracasei* usada nas composições dos exemplos doravante é *Lactobacillus paracasei* ST11 NCC 2461 (CNCM 1-2116).

### **Exemplos de composições para administração oral**

#### **Exemplo 1: Tubo de pó**

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Ingrediente ativo</b>	
<i>Lactobacillus paracasei</i> ST11	$10^{10}$ cfu
<b>Excipiente</b>	
Maltodextrina	qs 30 g
Goma xantana	0,8 mg
Benzoato de sódio	0,2 mg
Pode ser tomado um tubo por dia.	

#### **Exemplo 2: Cápsula**

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
	<b>mg/cápsula</b>
<i>Lactobacillus paracasei</i> ST11	$10^9$ cfu
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	$10^8$ cfu
Vitamina C	60
Estearato de magnésio	0,02
Podem ser tomadas uma a três cápsulas por dia.	

Exemplo 3: Formulação de tipo de comprimido revestido por açúcar

<b>Ingredientes</b>	<b>Mg/comprimido revestido por açúcar</b>
<b>Ingrediente ativo</b>	
<i>Lactobacillus paracasei</i> ST11	$5 \times 10^8$ cfu
<b>Excipiente do núcleo de comprimido revestido por açúcar</b>	
Celulose microcristalina	70
Encompress <sup>®</sup>	60
Estearato de magnésio	3
Sílica coloidal anidra	1
<b>Agente de revestimento</b>	
Goma-laca	5
Talco	61
Sacarose	250
Polividona	6
Dióxido de titânio	0,3
Agente corante	5
Este tipo de comprimido revestido por açúcar pode ser tomado 1 a 3 vezes por dia.	

Exemplo 4: Formulação de tipo de comprimido revestido por açúcar

<b>Ingredientes</b>	<b>Mg/comprimido revestido por açúcar</b>
<b>Ingrediente ativo</b>	
<i>Lactobacillus paracasei</i> ST11	10 <sup>9</sup> cfu
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	10 <sup>9</sup> cfu
<b>Excipiente do núcleo de comprimido revestido por açúcar</b>	
Celulose microcristalina	70
Encompress <sup>®</sup>	60
Estearato de magnésio	3
Sílica coloidal anidra	1
<b>Agente de revestimento</b>	
Goma-laca	5
Talco	61
Sacarose	250
Polividona	6
Dióxido de titânio	0,3
Agente corante	5
Este tipo de comprimido revestido por açúcar pode ser tomado 1 a 3 vezes por dia.	

Exemplo 6: Efeito de um suplemento alimentar compreendendo um microrganismo de acordo com a invenção na acne e imperfeições faciais em mulheres adultas

A estirpe *Lactobacillus paracasei* ST11 NCC 2461 (CNCM I-2116) foi testada sozinha, num estudo randomizado duplo cego.

Mulheres entre 18 e 40 anos de idade, tendo pele acneica e imperfeições faciais, foram divididas em vários grupos:

- um primeiro grupo de 33 mulheres, às quais foi administrado um placebo, sendo o placebo uma composição idêntica, mas contendo maltodextrina em lugar do microrganismo (doravante referido como "produto A"), e
- um segundo grupo de 33 mulheres, às quais for administrada uma composição contendo  $1 \times 10^9$  cfu da *Lactobacillus paracasei* ST11 acima mencionada, sozinha, (doravante referida como "produto B").

Estes suplementos alimentares foram administrados oralmente, durante 2 meses.

Os indivíduos foram avaliados aos D1, D15, D29, D42 e D57 por meio de várias avaliações clínicas.

Em particular, uma avaliação clínica das imperfeições faciais tais como discromia foi levada a cabo e os próprios indivíduos levaram a cabo uma autoavaliação da melhoria na condição da sua pele.

#### **a) Avaliações clínicas**

O critério principal para avaliação da eficácia é definido pelo número de lesões inflamatórias superficiais (pápulas e pústulas, sem distinção) e o número de lesões retencionais (comedões abertos e fechados, sem distinção).

As contagens foram realizadas pelo investigador em cada consulta (D1, D15, D29, D43 e D57) ao longo da face inteira (incluindo o queixo, mas não na zona T) por contagem visual, de acordo com a escala ECLA:



**Fator F 1: tipo e intensidade da acne na face inteira com pontuações de 0 a 5 (correspondendo a uma contagem de lesão) (0; < 5; 5 a 9; 10 a 19; 20 a 40; > 40)**

- Lesões não inflamadas: Comedões abertos e fechados com pontuações de 0 a 5 (correspondendo a uma contagem de lesão) (0; < 5; 5 a 9; 10 a 19; 20 a 40; > 40).

- Lesões inflamadas:

a) Superficiais: pápulas e pústulas com pontuações de 0 a 5 (correspondendo a uma contagem de lesão) (0; < 5; 5 a 9; 10 a 19; 20 a 40; > 40), e informação sobre o tamanho (de 0,1 cm a 0,5 cm)

b) Profundas: nódulos e quistos com pontuações de 0 a 5 (correspondendo a uma contagem de lesão) (0, 1, 2, 3, 4, 5), e informação sobre o tamanho (0,5 cm ou mais).

**Fator F 2: extensão e intensidade da acne para lá da face**

- Pescoço com classificação de 0 (ausente) a 3 (considerável) da zona cervical do topo e do fundo,

- Peito com classificação de 0 (ausente) a 3 (considerável),

- Costas com classificação de 0 (ausente) a 3 (considerável) (ponta da escápula superior e ponta da escápula inferior),

- Braço com classificação de 0 (ausente) a 3 (considerável).

**Fator F 3: cicatrizes**

Ausentes (0) ou presentes (1).

Podem ser inflamatórias, não inflamatórias ou escoriadas.

Além do mais, o investigador avaliar, a cada consulta (D1, D15, D29, D43 a D57), em escalas de 0 a 9:

a presença de marcas (sardas, marcas actínicas, despigmentação, sinais),  
enrugamento,  
a presença de manchas secas,  
escamas,  
dermatite seborreica.

O resultado desta avaliação é que o suplemento alimentar testado torna possível reduzir significativamente o número de lesões inflamatórias superficiais e o número de lesões retencionais, em comparação com a composição de placebo.

#### **b) Avaliação da seborreia**

A quantidade de sebo excretado à superfície da pele é avaliada usando um Sebumetre® (Courage & Khazaka).

É um método fotométrico. Uma tira de material sintético, que se torna transparente em contacto com lípidos absorvidos, é aplicada à zona de medição durante precisamente 30 segundos.

A transparência da referida tira aumenta então proporcionalmente com a quantidade de sebo do filme hidrofílico com a qual está em contacto.

O registo por refletometria torna possível quantificar o aumento da luz transmitida e assim determinar a massa total

de lípidos extraída por unidade área superficial (em  $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ ).

É levada a cabo uma medição na testa após deslipidação cuidadosa com álcool 70°.

De seguida, após meia hora, é levada a cabo uma medição adicional. É assim possível calcular a quantidade de sebo excretada por unidade de área superficial e por unidade de tempo.

O resultado deste teste é que o suplemento alimentar testado torna possível reduzir o reoleamento da pele em 50%, em comparação com a composição de placebo.

### **c) Análise da ecoflora geral da face**

A cada visita, foram tomadas amostras bacteriológicas, na fase dos indivíduos, com 2 ZARAGATOAs estéreis (Oxoid) para a ecoflora bacteriana.

#### Metodologia:

- 2 zonas de aproximadamente 5 cm por 1 cm são delimitadas em cada lado do nariz (1 no esquerdo e 1 no direito).

As localizações selecionadas são indicadas no caderno de notas de observação e permanecerão as mesmas para um dado indivíduo ao longo do estudo (e são identificadas com base em medições da ponta do nariz e do topo das orelhas).

- Com cada uma das 2 zaragatoas, a face é esfregada 5 vezes, e, depois, após se ter virado a zaragatoa ao contrário, é esfregada novamente duas vezes.

- A zaragatoa é fechada e armazenada a +4°C antes de transferência para o departamento de bacteriologia.

As duas zaragatoas são combinadas em 3 mL de PBS contendo 0,1% de Triton X, e vigorosamente agitadas durante pelo menos 30 segundos.

Esta suspensão representa a solução de *stock* (SS) da qual duas diluições de dez vezes sucessivas (1/10° - d1 e d2) serão levadas a cabo.

0,1 mL da SS serão plaqueados na superfície do ágar de modo a pesquisar *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

0,1 mL da SS, 0,1 mL da d1 e 0,1 mL da d2 serão plaqueados na superfície do ágar para a flora total, a flora anaeróbica, os cocos gram<sup>+</sup> e as corinebactérias.

Todas as inoculações serão realizadas em duplicado.

*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, a flora total, os cocos gram<sup>+</sup> e as corinebactérias são incubados a 35-37°C sob condições anaeróbicas durante 48 h.

A flora anaeróbica é incubada a 35-37°C sob condições anaeróbicas durante 5 a 6 dias.

É usado um meio sanguíneo (8 dias a 37°C sob condições anaeróbicas) para contagem de *Propionibacterium*, essencialmente *P. acnes*, para a flora da pele.

Tabela resumo

Ecoflora	Diluições	Meios	Descrição
Flora total	SS, d1, d2	TS* + Tween 80 a 1% Condições aeróbicas 37°C - 48 H	Meio de base não seletivo
Cocos gram <sup>++</sup>	SS, d1, d2	Columbia ANC** + Sangue de ovelha a 5% Condições aeróbicas 37°C - 48 H	Meio seletivo quanto a cocos gram <sup>++</sup> por adição da mistura antibiótica ANC (ácido nalidíxico e colistina) inibindo crescimento de bacilos gram <sup>-</sup>
Flora anaeróbica <i>P. acnes</i>	SS, d1, d	Columbia + sangue de ovelha a 5% Condições anaeróbicas 37°C - 5 dias	Incubação da ausência de oxigênio
Corinebactérias	SS, d1, d2	Columbia + sangue de ovelha a 5% Condições aeróbicas 37°C - 48 H	
<i>Escherichia coli</i>	SS	Meio Drigalski Condições aeróbicas 37°C - 48 H	Meio seletivo quanto a enterobactérias por adição de violeta de cristal que inibe bactérias gram <sup>+</sup> . Revela bactérias <sup>++</sup> quanto a lactose.
Estafilococos <sup>++</sup> quanto a Coagulase	SS	Baird Parker + RPF Condições aeróbicas 37°C - 48 H	Meio seletivo quanto a estafilococos <sup>++</sup> quanto a coagulase com leitura direta de estafilocoagulase.

A contagem indica que a flora anaeróbica (e em particular *Propionibacterium acnes* e corinebactérias) é reduzida em pacientes tendo seguido o tratamento com o suplemento alimentar contendo o agente ativo sob consideração, contribuindo assim para o restabelecimento da homeostase da pele.

#### **d) Expressão de proteínas**

Adicionalmente, aos momentos D1, D29 e D57, foram tiradas amostras da testa, com discos córneos, de modo a estudar a expressão de proteínas epidérmicas de indivíduos tratados.

Os discos córneos são discos adesivos feitos de um filme de poliéster transparente, flexível revestido com um adesivo, que é ele próprio transparente, que são relativamente insensíveis à oxidação e ao pó e proporcionam bom contacto com o estrato córneo. Esta técnica torna possível analisar a composição de certas proteínas da camada córnea.

A aplicação usando um dinamómetro calibrado é recomendada de modo a se obter uma pressão de aplicação constante de entre 100 e 250 g/cm<sup>2</sup>. Uma superfície limpa e seca permite adesão ótima no espaço de 5 segundos.

#### **Metodologia:**

Um retângulo 1×2 cm é delimitado numa zona da testa.

O disco córneo é colocado na minizona. O disco córneo é depois dobrado ao meio, de volta sobre si mesmo, com adesão da margem branca e colocado num tubo Nunc.

3 discos córneos são assim recuperados sucessivamente da mesma zona, e os três tubos Nunc são depois introduzidos em

nitrogénio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes da análise quantitativa de defensinas (mais particularmente, beta-defensina tipo 2, LL-37, elafina) e dos marcadores inflamatórios (TNF-alfa, IL-6, IL-8).

A amostragem é levada a cabo na testa aos momentos D1, D29, e D57 por disco córneo, de modo a se amostrar somente uma parte do estrato córneo, *i.e.*, um máximo de 4 a 5 camadas de estrato córneo.

Estas amostras de pele foram subsequentemente analisadas, após extração, por análise ELISA e pela técnica luminex.

Estas análises tornam possível mostrar que o microrganismo de acordo com a invenção estimula a expressão de algumas das proteínas de defesa antimicrobiana da epiderme (LL37, beta-defensina 2 e elafina) e certas citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL8).

A demonstração das proteínas acima mencionadas está então ligada a colonização diminuída pelos microrganismos *Malassezia furfur* e *Propionibacterium acnes* responsáveis pelos distúrbios da pele associados a pele oleosa e/ou pele com uma tendência oleosa.

Adicionalmente, a redução das citocinas inflamatórias participa também na redução de distúrbios de pele associados a pele oleosa e/ou pele com uma tendência oleosa.

Assim sendo, uma tal redução contribui para o restabelecimento de uma ecoflora equilibrada, a consequência do qual é uma diminuição nas condições

inflamatórias da pele e regulação da seborreia. Consequentemente, as imperfeições são reduzidas, e a compleição torna-se mais reluzente e mais homogénea, sem áreas de discromia e de secura.

Estes resultados mostram um efeito positivo para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e dos distúrbios de pele associados, e permitindo uma redução nos distúrbios de pele associados, tais como lesões retencionais do tipo comedão aberto ou fechado (microquisto, microcomedão, pontos brancos) e/ou imperfeições de pele sem brilho, reluzente ou esmaecida, ou tipo discromia.

Lisboa, 05 de Dezembro de 2014



### **REIVINDICAÇÕES**

1. Uso não terapêutico cosmético oral de uma quantidade eficaz de pelo menos um agente ativo para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou distúrbios associados a uma pele oleosa escolhido entre um defeito de descamação, uma compleição reluzente ou uma granularidade espessa da pele **caracterizado por** o referido agente ativo ser um microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei*.
2. Uso de uma quantidade eficaz de pelo menos um microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei*, para a preparação de uma composição oral para regulação da seborreia.
3. Uso de uma quantidade eficaz de pelo menos um microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei*, para a preparação de uma composição oral para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e dos distúrbios de pele associados.
4. Uso de acordo com a reivindicação precedente, para tratamento e/ou prevenção de acne e em particular acne comedonal, papulopustular e/ou nodular, acne congoblata e acne exógena.
5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado por** o microrganismo ser *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-2116.
6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, no qual o referido microrganismo é usado

numa proporção de 0,0001% a 20% por peso, em particular de 0,001% a 15% e mais particularmente de 0,01% a 10% por peso, em relação ao peso total da composição contendo-o.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, no qual o referido microrganismo é um primeiro microrganismo *Lactobacillus paracasei*, em combinação com pelo menos uma quantidade eficaz de pelo menos um segundo microrganismo distinto do referido primeiro microrganismo.
8. Método cosmético para tratamento e/ou prevenção de pele oleosa ou distúrbios associados a uma pele oleosa escolhidos entre um defeito de descamação, uma compleição reluzente ou uma granularidade espessa da pele, compreendendo pelo menos um passo de administração por rota oral, a um indivíduo, de uma quantidade eficaz de pelo menos um microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei*.
9. Método de acordo com a reivindicação precedente, no qual o microrganismo é como definido nas Reivindicações 5 a 6.
10. Um microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei*, para uso no tratamento e/ou prevenção, por rota oral, de pele oleosa ou pele com uma tendência oleosa e dos distúrbios de pele associados.
11. O microrganismo probiótico de acordo com a reivindicação precedente, para uso no tratamento e/ou prevenção, por rota oral, da acne.

- 12.** O microrganismo probiótico de acordo com a reivindicação precedente, para uso no tratamento e/ou prevenção, por rota oral, da acne comedonal, papulopustular e/ou nodular, acne congoblata e acne exógena.

Lisboa, 05 de Dezembro de 2014