ESTUDO DAS DIFERENTES FASES DA FÓRMULA DE HETTER; ANÁLISE HISTOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO DA EFETIVIDADE NO *PEELING*

Kevin Alves Antunes (PIBIC/UEPG), Aline da Silva Justo (Coautora), Flávio Luis Beltrame (Orientador), e-mail flaviobeltra@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Ciências biológicas; Morfologia; Histologia.

Palavras-chave: Óleo de Cróton, peeling de fenol, histologia.

Resumo

Hetter propôs uma formulação utilizada no *peeling* profundo que envolve o uso do fenol e do óleo de Croton. Ela é instável (forma duas fases) e de uso extemporâneo, portanto o projeto visa o estudo das camadas superior e inferior da solução final da fórmula para identificar qual fase tem maior efetividade. Será feita a avaliação histológica de tecidos em um modelo *in vivo* para determinação dos componentes da formulação. Para tal fim foram preparadas duas soluções, uma como controle positivo e outra para obter as duas fases; aplicadas em modelo suíno. Foram realizadas as biópsias do tecido e a análise histológica através de imagens microscópicas (analisadas pelo programa Image J®), para determinação da espessura do epitélio, celularidade, substância fundamental, fibras de colágeno e vasos sanguíneos. Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism® 5. Diferenças significativas foram observadas, sendo possível a identificação de qual das fases é mais efetiva. Neste trabalho foi identificado que a camada inferior apresenta atividade semelhante ao controle positivo, portanto, possivelmente os compostos ativos estejam presentes nesta fase da fórmula.

Introdução

Desde a antiguidade o ser humano utiliza as espécies vegetais como ornamento, alimento, vestimenta e principalmente como tratamento de enfermidades. Este uso justifica-se pela presença de diversas substâncias com características medicinais. Muito desse uso está associado a um conhecimento empírico empregado no tratamento de doenças, pois a utilização baseia-se na “fama” popular de algumas espécies (ALMEIDA, 2011).

Entre aproximadamente 300 mil espécies presentes no mundo, apenas 15% são utilizadas em pesquisas para delineamento químico e avaliação da sua atividade biológica ou toxicológica (BRANDÃO *et al.,* 2014). Algumas espécies que vem despertando o interesse científico no momento, pertence ao gênero Croton, que se classifica dentro da família Euphorbiaceae com mais de 8000 espécies distribuídas pelo mundo. (MACIEL, 2006)

A espécie *Croton tiglium* é comum nas regiões tropicais da Ásia. O seu fruto, *crotonis fructus* (CF), é popularmente utilizado popularmente para tratamento de distúrbios gastrointestinais e inflamatórios; é também uma fonte rica em óleo que contém principalmente ácido oleico, linoleico, eicosenoico (TSAI; TSAI & CHANG, 2004; HU *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014).

Estudos fitoquímicos têm apresentado o isolamento de algumas substâncias do óleo obtido do CF, que podem apresentar atividade biológica de relevância clínica, como por exemplo, diterpenos. Uma subclasse de diterpenos que está presente

neste óleo é a classe de metabólitos secundários dos ésteres de forbol, que podem ter atividade anti ou pró-inflamatória dependendo de sua dose, assim como uma atividade anti ou pró-cancerígena (GOEL *et al.*, 2007; KIM *et al.,* 2014; ZHANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016). Tal óleo é encontrado na prática médica como componente em uma formulação utilizada em clínicas médicas de dermatologia para a realização do procedimento estético de *peeling*; entretanto esse uso se faz de forma empírica há muitos anos.

O *peeling* com o uso de substâncias químicas é um procedimento que tem como objetivo a aceleração da esfoliação da pele, promovendo dessa forma, uma renovação celular. O então chamado *peeling* químico, tem em sua composição produtos cáusticos os quais promovem uma descamação controlada do epitélio, rejuvenescendo assim, a pele (VELASCO, 2004).

Baker (1961) a partir do conhecimento e da popularidade do *peeling* propôs uma formulação que passou a ser muito utilizada empiricamente na dermatologia. Nesta fórmula foram propostas e determinadas às quantidades dos componentes: fenol (47%), óleo de *Croton* (1,2%), septisol® (2,6%) e *q.s.p.* para a água. Com o passar dos anos a fórmula foi aperfeiçoada por estudiosos, e atualmente a fórmula de Hetter (HETTER, 1999), composta por fenol 88% (48,5%), óleo de *Croton* (2%), septisol® (2,6%) e *q.s.p.* para a água tem sido mais utilizada.

Estudos científicos que justifiquem o uso da formulação na dermatologia e o estudo de seus componentes é importante. Inclusive Baker quando adicionou o óleo na fórmula relatou que essa matriz vegetal é um “ingrediente importante” para a obtenção do resultado médico esperado, mas sem um embasamento científico para isso (HETTER, 1999). Há controvérsias sobre o que causa o efeito biológico nas fórmulas de *peeling* contendo o óleo de *Croton* e o fenol.

Apesar da fórmula apresentar ótimos resultados, a presença do fenol é um agravante, pois esta substância apresenta alta toxicidade. Dentre os efeitos tóxicos pode-se observar arritmia cardíaca, fibrilação atrial e ventricular, contrações ventriculares prematuras e hipotensão, desta forma alguns pacientes não podem realizar o procedimento contendo esta substância ou o médico dermatologista deve realizar o procedimento com cautela e cuidado, seguindo um protocolo de aplicação (KADUNC &VANTI, 2009).

Com o aumento da popularidade do *peeling* utilizando fenol e óleo de *croton*, é necessário estudar melhor essa formulação e seus componentes para se entender melhor a atividade observada no procedimento do *peeling*.

Material e Métodos

Foi obtido o óleo de Cróton (Delasco®) de fonte comercial. Esse óleo foi utilizado para preparo da solução estoque (Fenol – 96%, óleo de Cróton – 4%); por sua vez, a solução estoque foi empregada no preparo das formulações teste. Para preparo das soluções teste, adicionou-se a um frasco 40% da solução estoque, 55% de água e 5% de Septisol®. Após a adição de todos os componentes, os mesmos foram homogeneizados para se obter a fórmula de Hetter que foi utilizada nos experimentos (controle positivo). Foi preparada mais uma formulação que foi utilizada para obtenção da camada superior e inferior (para a obtenção dessas camadas, após a homogeneização da fórmula, a mesma foi deixada em descanso por 10 minutos para separação das duas fases); com uma seringa e cautelosamente uma das amostras foi retirada e transferida para outro recipiente.

Para a avaliação da atividade dermatológica, o experimento foi inicialmente autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (processo CEUA –

ISSN 1676-0093

037/2016) (protocolo UEPG – 10922/2016). Assim 4 suínos (2 machos e 2 fêmeas) foram anestesiados antes dos procedimentos. Utilizando a região dorsal e as laterais, foram demarcados *spots* 2x2 cm e espaço de 2 cm entre cada *spot*. Sobre cada um desses *spots* foi realizada a aplicação das amostras com o uso de um *swab*. Após 1, 7 e 21 dias da aplicação, foi retirada uma amostra do tecido do animal com o auxílio de um Punch (4 mm) descartável. Esse procedimento de coleta foi repetido nos dias 1, 7 e 21 após a aplicação das formulações.

Após as coletas, as amostras foram mantidas imediatamente em formol. Após 72 horas o formol foi trocado por etanol até o processamento das amostras em parafina histológica para a realização de cortes e montagem de lâminas. Os cortes obtidos foram corados pelo método tradicional de Hematoxilina de Mayer para análise microscópica de imagens (aumento de 20x). As imagens obtidas foram analisadas pelo programa Image J® para determinação da espessura do epitélio, celularidade, substância fundamental, fibras de colágeno e vasos sanguíneos. Esta análise foi *cega* (sem o conhecimento de qual tratamento era referente a cada imagem). Os dados foram tabulados e avaliados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism® 5.

Resultados e Discussão

Através desta metodologia foi possível obter os resultados que estão exemplificados na Figura 1. O gráfico abaixo demonstra os dias nos quais foram aplicadas as amostras (dia 1, 7 e 21), sendo as amostras divididas em 4 tipos: Controle negativo (C-), Controle positivo (C+), Camada Superior (CS) e Camada Inferior (CI).

Diferenças nas atividades das amostras na epiderme frente as fases da fórmula de Hetter:



Figura 1: Resultados obtidos através da análise da espessura do epitélio.

A análise desses resultados permite determinar a diferença encontrada na espessura da epiderme conforme se passaram os dias, principalmente sendo vista essa desigualdade nas amostras de pele de porco tratadas com a CI e não contendo tanta diferença na CS quando comparado ao C+. Pode-se considerar que as substâncias ativas se concentram na CI da fórmula.

Conclusão/ões

É conclusivo com o trabalho realizado que as fases da formulação de Hetter apresentam diferenças significativas na efetividade como *peeling*. A camada inferior demonstra uma atividade mais notória conforme os dias se passam e comparado ao controle positivo possui atividade semelhante. Já a camada superior tem sua atividade bem menos pronunciada. Com essas dessemelhanças vistas, pode-se concluir que os ativos responsáveis pelo *peeling* estão em maiores concentrações

na CI. Este resultado é válido para pesquisas futuras, com o intuito de propor reajustes à formulação que lhe proporcione maior estabilidade e efetividade. Vale ressaltar que é importante a continuidade da pesquisa principalmente quimicamente para justificar estes efeitos sobre a epiderme.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me deu forças e energia para concluir todo esse trabalho. Ao Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame, pela contribuição de seus conhecimentos e sugestões na orientação deste trabalho. A minha coorientadora Mestranda Aline da Silva Justo, pelo suporte que lhe coube, pelas correções e incentivos. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Referências

ALMEIDA, M. Z. Plantas medicinais. 3. ed. Salvador: Edufba, cap. 1. p. 33-46, 2011. Disponível em: <**http://www.repositorio.ufba.br:8080/ri/bitstream/ri/5376/1/Plantas_medicinais_3ed_RI.pdf**>.

BAGATIN, E.; HASSUN, K.; TALARICO, S.. **Revisão sistemática sobre peelings químicos. Surgical & Cosmetic Dermatology**, São Paulo, v. 1, p.37-46, 2009.

BAKER, T. J.; **Chemical face peeling and rhytidectomy: A combined approach forfacial rejuvenation**. Plast. Reconstr. Surg.; v. 29: p.199, 1962.

BRANDÃO, M. G. L. et al. **Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais.** Researchgate, Minas Gerais, v. 1, n. 1, p.5-15, abr. 2014.

GOEL, G. et. al.; **Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals**; Int. J. Toxicol.; v. 26; p. 279; 2007.

HETTER, G. P.; **An Examination of the Phenol–Croton Oil Peel: Part I. Dissecting the Formula; Plastic and Reconstructive Surgery**, Ontario, Canadá, v. 105, n. 1, p.227-239, 1999.

HETTER, G. P.; **An Examination of the Phenol–Croton Oil Peel: Part IV. Face Peel Results with Different Concentrations of Phenol and Croton Oil; Plastic and Reconstructive Surgery**, Ontario, Canadá, v. 105, n. 1, p.1063-1083, 2000.

KADUNC, B. V.; A VANTI, A. **Avaliação da toxicidade sistêmica do fenol em peelings faciais.** Surgical & Cosmetic Dermatology, São Paulo, v. 1, p.10-14, 2009.

MACIEL, M. A. M. et al. **O gênero Croton e Aspectos Relevantes de Diterpenos Clerodanos**. Disponível em: **https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/18405**.

TSAI, J.-C.; TSAI, S.; CHANG, W.-C.; "**Effect of ethanol extracts of three Chinese medicinal plants with anti-diarrheal properties on ion transport of the rat intestinal epithelia," Journal of Pharmacological Sciences**, vol. 94, no. 1, p. 60–66, 2004.

VELASCO, M. V. R. et al. **Facial skin rejuvenation by chemical peeling: focus on phenol peeling. An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 79, p.91-99, 2004.

WANG, J. et al.; **Five new phorbol esters with cytotoxic and selective anti-inflammatory activities from Croton tiglium. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 25, n. 9, p.1986-1989, 2015.

ZANINI, M.; M. FILHO, C. D. A. S.. **Depigmentation therapy for generalized vitiligo with topical 88% phenol solution**. Anais Brasileiros de Dermatologia, São Paulo, v. 80, n. 4, p.415-416, 2005.