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

Kevin Alves Antunes (PROVIC), Flávio Luis Beltrame (Orientador), Aline da Silva Justo (Co-orientadora), 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

A formulação utilizada no *peeling* proposta por Hetter envolve o uso do fenol e do óleo de Croton. Ela é instável (forma duas fases) e uso extemporâneo, portanto o projeto visa o estudo das camadas superior e inferior da solução final da fórmula de Hetter para identificar qual fase tem maior efetividade, sendo feito a avaliação histológica de tecidos em um modelo *in vivo*. Para tal fim foram preparadas duas soluções de Hetter, uma como controle positivo e outra para obter as duas fases, então foram aplicadas em modelo suíno, e dessa forma, foi realizado a biópsia do tecido e a análise histológica através de imagens microscópicas que foram analisadas pelo programa Image J®, e foi avaliado a espessura do epitélio. Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism® 5. As diferenças significativas entre as amostras obtidas foram observadas, sendo possível a identificação de qual das fases estudas é mais efetiva como *peeling*. Neste trabalho foi identificado que a Camada Inferior apresenta atividade semelhante ao controle positivo, portanto, possivelmente os compostos ativos ficam presente nesta fase da fórmula de Hetter.

## Introdução

Formas de retardar o envelhecimento estão sendo estudadas atualmente. Um modo encontrado para tal fim utilizada na clínica médica é o chamado "*peeling* de fenol" que promove uma descamação controlada do epitélio, favorecendo a regeneração de um tecido saudável. Sobre esta preparação, é crescente a pesquisa sobre o assunto, porém é necessária uma análise crítica sobre tal atividade. (BAGATIN, 2009).

O *peeling* na qual se utiliza o fenol, também contêm em sua composição o óleo de *Croton*. Não se sabe ao certo se é o óleo de *Croton* ou o fenol que é o responsável pela ação, já que a fórmula de Hetter é instável e seu uso é extemporâneo, visto que após alguns minutos de seu preparo, ocorre a formação de duas fases e os possíveis ativos responsáveis pelo efeito terapêutico desejado não estão distribuídos igualmente por toda a formulação. Além do mais, é conhecido cientificamente que o fenol é uma substância altamente tóxica, causadora de arritmia cardíaca, hipotensão e fibrilação atrial e ventricular (KADUNC e VANTI, 2009) e os constituintes químicos presentes no óleo de Croton podem causar uma série de efeitos desde terapêuticos até tóxicos.

Portanto, esperou-se através desses procedimentos estudar as diferenças significativas entre as amostras obtidas e identificar qual das fases é mais efetiva

como *peeling*, visto que isso determinará a maior concentração de substâncias responsáveis por esse efeito em uma das fases, favorecendo estudos posteriores.

## Materiais e Métodos

Foi obtido o óleo de Cróton (Delasco®) de fonte comercial sendo utilizado para preparo da solução estoque (Fenol – 96%, óleo de Cróton – 4%), usado para preparo das formulações teste que foram empregadas para o procedimento de análise, onde em um frasco adicionou-se a solução estoque, água e o Septisol®, sendo os componentes homogeneizados, e assim, obteve a fórmula de Hetter. Foram preparadas duas fórmulas de Hetter, uma considerada como controle positivo e a segunda utilizada para obtenção da camada superior e inferior que foi mantida em descanso por 10 minutos para completa formação das duas fases, com uma seringa e cautelosamente uma das amostras foi retirada e transferida para outro recipiente. As concentrações e componentes de cada amostra estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Amostras preparadas para o experimento *in vivo*

| *Amostras* | | *Formulação* | *(%)* |
|---|---|---|---|
| *1* | Controle negativo | Água | 95 |
| | | Septisol | 5 |
| *2* | Controle positivo<br>Formulação de Hetter recém-preparada<br>(a partir da solução estoque) | Água | 55 |
| | | Septsol | 5 |
| | | Solução estoque | 40 |
| *3* | Camada superior da solução final | Água | 55 |
| | | Septisol | 5 |
| | | Solução estoque | 40 |
| *4* | Camada inferior da solução final | Água | 55 |

Para a avaliação da atividade dermatológica, o experimento foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (processo CEUA – 037/2016) (protocolo UEPG – 10922/2016), onde foi previsto o uso de 4 suínos, sendo 2 machos e 2 fêmeas sendo os animais anestesiados antes dos procedimentos.

Utilizando a região dorsal e as laterais, foram demarcados spots 2x2 cm e espaço de 2 cm entre cada spot, no qual foi realizada a aplicação das amostras com o uso de um swab dentro das lacunas. Com o auxílio de um Punch (4 mm) descartável foi realizada a coleta do material nos dias 1, 7 e 21 após a aplicação das formulações;

As amostras foram mantidas em formol, e após 72 horas o formol foi trocado por etanol. Foram processadas e incluídas 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), que foram analisadas pelo programa Image J®, foi analisado a espessura do epitélio, esta análise foi *cega* (sem o conhecimento de qual tratamento era referente à 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 postivo (C+), Camada Superior (CS) e Camada Inferior (CI).

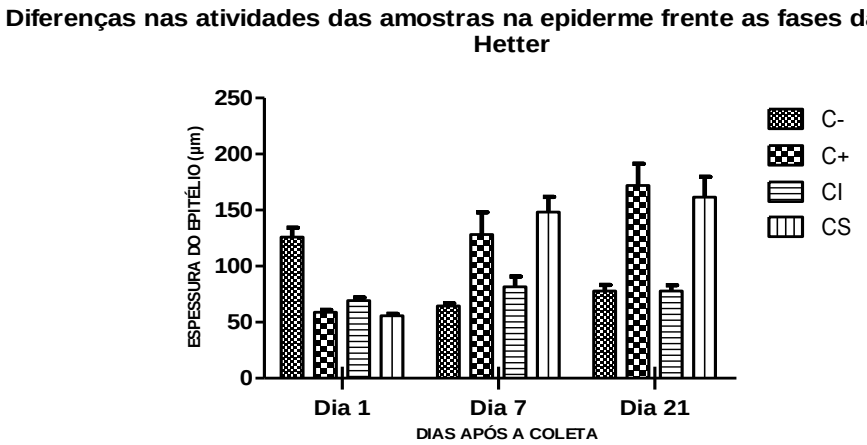



**Figura 1:** Resulltados obtidos através da análise da espessura do epitélio.

Com estes resultados, é notória a diferença encontrada na espessura da epiderme conforme se passaram os dias, principalmente sendo vista essa desigualdade na CI e não contendo tanta diferença na CS – comparado ao C+, desta forma pode-se considerar que as substâncias ativas se concentram na CI da fórmula.

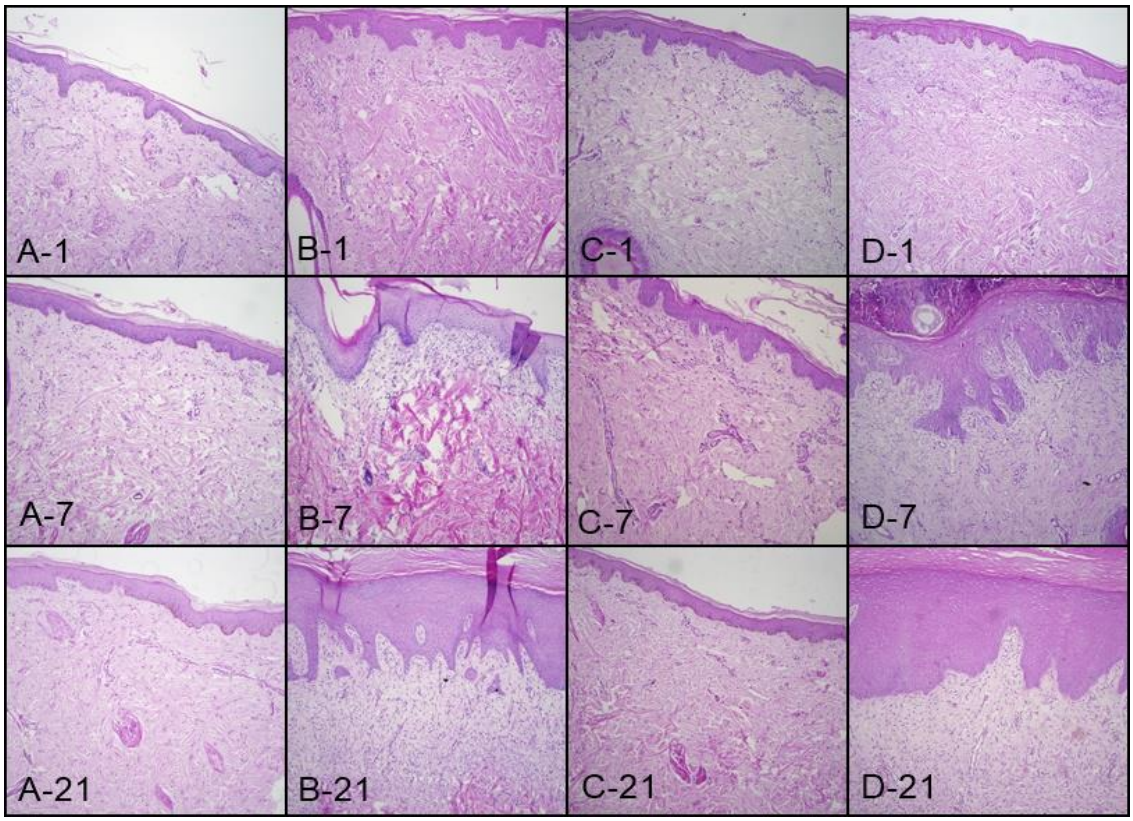



**Figura 2:** Microfotografias referente às biópsias realizadas e seus respectivos tratamentos

Imagens tiradas no aumento de 10x para análise geral da estrutura do tecido, mas as avaliações do epitélio foram realizadas no aumento de 20x. A – C-, B – C+, C – CS e D – CI. 1, 7 e 21 é referente ao tempo de coleta da biópsia após a aplicação das amostras.

É notório que o controle negativo teve diferença na espessura mesmo não incluindo a solução estoque pois os testes foram feitos de forma randomizada, onde as aplicações das amostras foram feitas em animais diferentes na qual a espessura é desigual, e dessa forma, obteve-se resultados dissemelhantes, sendo essa causa comprovada por outros estudos, mas ao observar as fotografias do tecido (Figura 2) é possível observar diferenças específicas sobre o tecido íntegro (C-) e o tecido que sofreu o processo de *peeling* (C+ e CI). (TURNER, N. J, 2014)

## Conclusões

É conclusivo com o trabalho realizado que as fases da formulação de Hetter apresentam diferenças significativas na efetividade como *peeling*. Com o gráfico obtido através do programa GraphPad Prism® 5, é visto tais diferenças.

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 comparado com a CS, 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 desta dissertação.

A minha co-orientadora 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

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

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.; VANTI, A. A. **Avaliação da toxicidade sistêmica do fenol em peelings faciais**.2009.

TURNER, Neill J.; PEZZONE, Dominic; BADYLAK, Stephen F.. **Regional Variations in the Histology of Porcine Skin.**2014.