

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BRUNA MIKULIS LEMES

**EXPLORANDO NOVAS POSSIBILIDADES DE FORMULAÇÕES A PARTIR DO
PEELING DE FENOL COM ÓLEO DE *Croton tiglium* (FÓRMULA DE HETTER)**

**PONTA GROSSA
2021**

BRUNA MIKULIS LEMES

**EXPLORANDO NOVAS POSSIBILIDADES DE FORMULAÇÕES A PARTIR DO
PEELING DE FENOL COM ÓLEO DE *Croton tiglium* (FÓRMULA DE HETTER)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Priscileila Colerato Ferrari

**PONTA GROSSA
2021**

L552 Lemes, Bruna Mikulis
Explorando novas possibilidades de formulações a partir do
peeling de fenol com óleo de *Croton tiglium* (fórmula de Hetter)
/ Bruna Mikulis Lemes. Ponta Grossa, 2021.
77p.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de
Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame
Coorientadora: Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari

1. *Peeling* profundo. 2. *Croton tiglium*. 3. Novisol. 4. Ácido
glicólico. 5. Ácido tricloroacético. I. Beltrame, Flávio Luís
(Orient.). II. Ferrari, Priscileila Colerato (Coorient.).
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em Ciências
Farmacêuticas. III.T.

CDD : 615

FOLHA DE APROVAÇÃO - ATA



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas



Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa

Ponta Grossa, 03 de março de 2021.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 02/2021 DA DOUTORANDA BRUNA MIKULIS LEMES REALIZADA NO DIA 03 DE MARÇO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos três dias de março de dois mil e vinte e um, às 16h00min, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Flávio Luis Beltrame reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda Bruna Mikulis Lemes, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pelo Professor Doutor Flávio Luis Beltrame (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Eduardo Bauml Campagnoli (UEPG/PR), Leandro Cavalcante Lipinski (UEPG/PR), Bruno Rodrigo Minozzo (SESA/PR) e Patrícia Mazureki Campos (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **“EXPLORANDO NOVAS POSSIBILIDADES DE FORMULAÇÕES A PARTIR DO PEELING DE FENOL COM ÓLEO DE *Croton tiglium* (FÓRMULA DE HETTER)”**

Encerrada a defesa, a banca considerou aprovada a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia – Fone (42) 3220-3337 – ppgcf@hotmail.com

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa



Flávio Luis Beltrame 1 - (DEFAR - UEPG) Presidente

Eduardo Baumli Campagnoli 2 - (DEODON - UEPG) – Titular

Leandro Cavalcante Lipinski 3 - (DEMED-UEPG) – Titular

Bruno Rodrigo Minozzo 4 – (SESA - PR) – Titular

Patrícia Mazurecki Campos 5 - (DEFAR - UEPG) – Titular

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia – Fone (42)
3220-3337 – ppgcf@hotmail.com

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, em todas as suas manifestações, por sempre me dar os instrumentos necessários para chegar até aqui, por me guiar e sustentar no caminho da construção do conhecimento e do meu próprio ser. Que tão amorosa e sabiamente me ajudou a transpor as barreiras e desafios que surgiram.

Ao Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame que, ao longo de mais de dez anos de orientação, nunca mediu esforços para proporcionar o melhor desenvolvimento possível tanto nos trabalhos quanto pessoal, não apenas para mim quanto para todos a sua volta, ensinando com suas palavras, mas principalmente com sua postura. Pelos conhecimentos partilhados, pelas inúmeras vezes em que cedeu seu tempo para discutir assuntos da pesquisa ou pessoais, pela liberdade e confiança que depositou em mim, enfim por todas as coisas que fez e que possibilitaram o desenvolvimento deste e de outros trabalhos. Espero um dia poder retribuir tudo isso. Saiba que possui minha admiração como profissional e ser humano. Obrigada!

À minha família que amo tanto e que sempre me apoiou em minhas escolhas, por acreditarem em mim, me incentivarem sempre, principalmente nos momentos mais difíceis e por vibrarem a cada conquista, sem vocês nada disso seria possível!

Ao meu amigo Bruno R. Minozzo, que esteve todos esses anos trabalhando, se divertindo, ajudando e crescendo juntos. Pelo apoio, incentivo e por tantas conversas produtivas que fizeram o caminho mais leve e menos solitário.

Aos colegas e amigos do grupo de pesquisa, tantos que vieram e já seguiram seus caminhos, todos contribuíram de alguma maneira nessa caminhada, mas principalmente à Aline da S. J. Machado, Luiza S. Cruz, Evelyn A. de Andrade, Bruna Nunes e Isadora Machinski, com os quais constituo uma família, compartilho, confio, divido trabalho, angústias e conquistas. À Aline que neste projeto em especial foi minha parceira, sem você esta etapa teria sido muito mais difícil, muito obrigada pela sua amizade. À Prof^a. Dr^a. Priscileila Colerato Ferrari pela coorientação, por partilhar seus conhecimentos e acreditar em mim e neste projeto, permitindo trocas não apenas profissionais como pessoais.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, bem como aos órgãos de fomento; a CAPES e a Fundação Araucária por possibilitarem a realização deste trabalho. Aos professores do PPGCF pelos ensinamentos e pela boa convivência que sempre permitiu a troca de conhecimento, a colaboração e crescimento de nós, pós-graduandos.

Aos professores Dr. Leandro Lipinski e Dr. Eduardo Bauml Campangoli e seus alunos pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Ao Dr. Carlos Gustavo Wambier pela parceria neste projeto, pelas discussões produtivas que permitiram o aprimoramento do trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, estiveram presentes em minha vida, possibilitando a conclusão desta etapa.

RESUMO

A busca pela beleza e para atenuar os danos ocasionados pelo envelhecimento e fotoenvelhecimento é constante. Neste cenário, os procedimentos de *peeling* se destacam por promover a regeneração da pele pela indução de processo inflamatório. O *peeling* químico que emprega fenol e óleo de *Croton tiglium* (OC) se destaca pelos bons resultados gerados. Apesar da sua efetividade, o fenol apresenta alta toxicidade e instabilidade dessas formulações. Assim, é importante propor o desenvolvimento de produtos que explorem o potencial do OC e que sejam mais seguros e estáveis. Acrescenta-se que com a descontinuação do Septisol[®] em 2019, tem ocorrido sua substituição por Novisol[®], o que deixou a fórmula mais homogênea. Entretanto, esta importante mudança na composição da fórmula trouxe a necessidade de novos estudos. O presente trabalho propôs avaliar preliminarmente três abordagens de formulações contendo OC: substituição do fenol por agentes químicos já empregados em *peeling*, com menor toxicidade (ácido glicólico – AG – e ácido tricloroacético – ATA); administração de cristais líquidos (CL) obtidos a partir de sistemas ternários (ácido oleico/PPG-5-CETETH-20/água) para promover a permeação do OC; e avaliar as implicações da mudança de concentração de OC em fórmulas contendo Novisol[®]. Na primeira abordagem, as formulações foram preparadas com base na fórmula de Hetter, substituindo o fenol por AG ou ATA. Para os CL, a partir dos diagramas de fases ternários, com e sem OC, foram selecionadas 3 formulações da fase cúbica e 2 da fase lamelar. Para o Novisol[®], as formulações foram preparadas com base na fórmula de Hetter nas concentrações de 0,8% e 2,4% de OC. Para avaliação das abordagens, realizou-se ensaio *in vivo* (modelo suíno), sendo as biópsias realizadas em 1, 7 e 21 dias após os tratamentos. Os tecidos foram corados com Hematoxilina-Eosina e Herovici a fim de avaliar componentes histomorfométricos e diferenciar colágeno tipo I e tipo III, respectivamente. Para a primeira abordagem e formulação contendo AG demonstrou-se inferior à formulação contendo ATA, esta possivelmente foi capaz de gerar processo inflamatório no dia 1 e também aumento de fibroblastos no dia 21. Foi possível obter os CL no sistema proposto, porém os mesmos não foram capazes de gerar reação inflamatória na derme, sugerindo que não houve permeação do OC no modelo testado. As formulações com Novisol[®] demonstraram ótimos resultados; todas tiveram um acréscimo de células no dia 1, destacando-se a formulação contendo 2,4% de OC, que promoveu maior quantidade de colágeno em 21 dias após aplicação. O ATA destacou-se como um bom agente químico a ser melhor explorado em formulações com OC; os CL requerem maiores estudos para permitir seu uso tendo o OC como ativo; e formulação com Novisol[®] e 2,4% de OC destacou-se como a alternativa mais promissora. Portanto, o presente trabalho deixa perspectivas a serem desenvolvidas em três distintas abordagens: o ATA como substituto do fenol com menor toxicidade, os CL como sistemas que permitem usufruir os benefícios do OC para a pele e, especialmente, as vantagens do uso de Novisol[®], que proporcionou resultados superiores.

Palavras-chave: ácido glicólico, ácido tricloroacético, *peeling* profundo, fenol, *Croton tiglium*, cristais líquidos, Novisol[®].

ABSTRACT

The demand for beauty and to mitigate the damage caused by aging and photoaging is constant. In this scenario, peeling procedures stand out for promoting skin regeneration by inducing an inflammatory process. The chemical peeling that uses phenol and *Croton tiglium* oil (OC) stands out for the good results generated. Despite its effectiveness, phenol has high toxicity and instability in these formulations. Thus, it's important to propose the development of products that exploit the potential of OC and that are safer and more stable. In addition, with the discontinuation of Septisol[®] in 2019, it has been replaced by Novisol[®], which left the formula more homogeneous. However, this important change in the composition of the formula brought the need for further studies. The present study proposed a preliminary evaluation of three approaches to formulations containing OC: replacement of phenol by chemical agents already used in peeling, with less toxicity (glycolic acid – AG – and trichloroacetic acid – ATA); administration of liquid crystals (LC) obtained from ternary systems (oleic acid/PPG-5-CETETH-20/water) to promote OC permeation; and assess the implications of changing OC concentration in formulas containing Novisol[®]. In the first approach, the formulations were prepared based on Hetter's formula, replacing phenol by AG or ATA. For the LC, from the ternary phase diagrams, with and without OC, 3 formulations of the cubic phase and 2 of the lamellar phase were selected. For Novisol[®], the formulations were prepared based on Hetter's formula at concentrations of 0.8% and 2.4% of OC. To assess the approaches, an *in vivo* test (swine model) was performed, with biopsies performed at 1, 7 and 21 days after the treatments. Tissues were stained with Hematoxylin-Eosin and Herovici in order to evaluate histomorphometric components and differentiate collagen type I and type III, respectively. For the first approach, the formulation containing AG was inferior to the formulation containing ATA, which was possibly able to generate an inflammatory process on day 1 and also an increase in fibroblasts on day 21. It was possible to obtain LC in the proposed system, but they were not able to generate an inflammatory reaction in the dermis, suggesting that there was no permeation of the OC in the tested model. Formulations with Novisol[®] showed excellent results; all had an increase in cells on day 1, highlighting the formulation containing 2.4% of OC, which promoted a greater amount of collagen in 21 days after application. ATA stood out as a good chemical agent to be better explored in formulations with OC; CL require further studies to allow its use with the OC as active component; and formulation with Novisol[®] and 2.4% of OC stood out as the most promising alternative. Therefore, the present work leaves perspectives to be developed in three distinct approaches: ATA as a substitute for phenol with less toxicity, LC as systems that allow you to enjoy the benefits of OC for the skin and, especially, the advantages of using Novisol[®], which provided superior results.

Keywords: glycolic acid, trichloroacetic acid, deep peeling, phenol, *Croton tiglium*, liquid crystals, Novisol[®].

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia – representação das camadas da pele de suíno (corado com hematoxilina-eosina, capturado em aumento de 40x).	16
Figura 2. Estrutura química do colágeno tipo I. a) Cadeia polipeptídica; b) Enovelamento da tripla-hélice; c) Microfibrilas.....	17
Figura 3. Ilustração dos tipos de <i>peeling</i> de acordo com as camadas da pele de suíno.....	19
Figura 4. Estrutura química do fenol.	20
Figura 5. Os principais diterpenos polióis do óleo de Croton [forbol (1a), 4 α -forbol (2), 4-desoxi-4 α -forbol (3a)].	23
Figura 6. Estrutura química do ácido glicólico - A (AG) - e do ácido tricloroacético - B (ATA).	25
Figura 7. Esquema da transição dos CL liotrópicos: (a) fase cúbica, (b) fase hexagonal e (c) fase lamelar.....	26
Figura 8. Modelo de diagrama de fases ternário indicando a composição: 30% de tensoativo, 40% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.	27
Figura 9. Estrutura química do Polietileno-glicol-hexadecil-eter (PPG-5-Ceteth-20 – Brij®58, Sigma-Aldrich).	28
Figura 10. Estrutura química do triclosan (C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂ – A) e do sulfonato de sódio olefina C ₁₄ -16 (C ₁₄ H ₂₇ NaO ₃ S – B).	28
Figura 11. Diagrama de fases ternário indicando a composição: 30% de Brij®58, 40% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.....	32
Figura 12. Esquema das demarcações dos <i>spots</i> para aplicação das formulações do experimento <i>in vivo</i>	34
Figura 13. Fluxograma do ensaio <i>in vivo</i> até as análises histomorfométricas.	36
Figura 14. Quantidade de células na derme de suínos, após 1, 7 e 21 dias da aplicação das formulações (C ⁻ , C ⁺ , F.AG e F.ATA).....	39

Figura 15. Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do C ⁺ e F.ATA (1, 7 e 21 dias).	40
Figura 16. A - Fotomicrografias da derme de suínos após 21 dias da aplicação do C ⁻ e F.ATA; . B - Quantidade de colágeno total na derme de suínos após 21 dia de aplicação das formulações (C ⁻ , C ⁺ , F.AG e F.ATA) representada em porcentagem.	42
Figura 17. Quantidade de células na derme de suínos, após 1, 7 e 21 dias da aplicação das formulações (C ⁻ , C ⁺ , F.AG e F.ATA).	43
Figura 18. Distribuição dos componentes histológicos na derme de suínos, após 21 dias da aplicação das formulações (C ⁻ , C ⁺ , F.AG e F.ATA).	44
Figura 19. Fotomicrografias obtidas por MLP evidenciando a fase cúbica da amostra contendo 30% água/40% Brij [®] 58/30% ácido oleico+OC e a fase lamelar (Cruz de Malta e anisotropia estriada) da amostra contendo 60% água/30% Brij [®] 58/10% ácido oleico+OC (aumento de 500x).	45
Figura 20. Estrutura química dos tensoativos aniônicos presentes no Septisol [®] e no Novisol [®] e seus respectivos valores de EHL.	46
Figura 21. A - Quantidade de células na derme de suínos após 1 dia de aplicação das formulações (NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4) representada em porcentagem. B - Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4.	48
Figura 22. A - Quantidade de células na derme de suínos após 21 dias de aplicação das formulações (NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4) representada em porcentagem. B - Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4.	49
Figura 23. Quantidade de colágeno na derme de suínos após 21 dias de aplicação das formulações (NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4) representada em porcentagem.	50
Figura 24. Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4; aumento de 400x, coloração HR.	51

LISTA DE TABELAS

Figura 1. Fotomicrografia – representação das camadas da pele de suíno (corado com hematoxilina-eosina, capturado em aumento de 40x).	16
Figura 2. Estrutura química do colágeno tipo I. a) Cadeia polipeptídica; b) Enovelamento da tripla-hélice; c) Microfibrilas.....	17
Figura 3. Ilustração dos tipos de <i>peeling</i> de acordo com as camadas da pele de suíno.....	19
Figura 4. Estrutura química do fenol.	20
Figura 5. Os principais diterpenos polióis do óleo de Croton [forbol (1a), 4 α -forbol (2), 4-desoxi-4 α -forbol (3a)].	23
Figura 6. Estrutura química do ácido glicólico - A (AG) - e do ácido tricloroacético - B (ATA).	25
Figura 7. Esquema da transição dos CL liotrópicos: (a) fase cúbica, (b) fase hexagonal e (c) fase lamelar.....	26
Figura 8. Modelo de diagrama de fases ternário indicando a composição: 30% de tensoativo, 40% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.	27
Figura 9. Estrutura química do Polietileno-glicol-hexadecil-eter (PPG-5-Ceteth-20 – Brij®58, Sigma-Aldrich).	28
Figura 10. Estrutura química do triclosan (C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂ – A) e do sulfonato de sódio olefina C ₁₄ -16 (C ₁₄ H ₂₇ NaO ₃ S – B).	28
Figura 11. Diagrama de fases ternário indicando a composição: 30% de Brij®58, 40% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.....	32
Figura 12. Esquema das demarcações dos <i>spots</i> para aplicação das formulações do experimento <i>in vivo</i>	34
Figura 13. Fluxograma do ensaio <i>in vivo</i> até as análises histomorfométricas.	36
Figura 14. Quantidade de células na derme de suínos, após 1, 7 e 21 dias da aplicação das formulações (C ⁻ , C ⁺ , F.AG e F.ATA).....	39

Figura 15. Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do C ⁺ e F.ATA (1, 7 e 21 dias).	40
Figura 16. A - Fotomicrografias da derme de suínos após 21 dias da aplicação do C ⁻ e F.ATA; . B - Quantidade de colágeno total na derme de suínos após 21 dia de aplicação das formulações (C ⁻ , C ⁺ , F.AG e F.ATA) representada em porcentagem.	42
Figura 17. Quantidade de células na derme de suínos, após 1, 7 e 21 dias da aplicação das formulações (C ⁻ , C ⁺ , F.AG e F.ATA).	43
Figura 18. Distribuição dos componentes histológicos na derme de suínos, após 21 dias da aplicação das formulações (C ⁻ , C ⁺ , F.AG e F.ATA).	44
Figura 19. Fotomicrografias obtidas por MLP evidenciando a fase cúbica da amostra contendo 30% água/40% Brij [®] 58/30% ácido oleico+OC e a fase lamelar (Cruz de Malta e anisotropia estriada) da amostra contendo 60% água/30% Brij [®] 58/10% ácido oleico+OC (aumento de 500x).	45
Figura 20. Estrutura química dos tensoativos aniônicos presentes no Septisol [®] e no Novisol [®] e seus respectivos valores de EHL.	46
Figura 21. A - Quantidade de células na derme de suínos após 1 dia de aplicação das formulações (NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4) representada em porcentagem. B - Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4.	48
Figura 22. A - Quantidade de células na derme de suínos após 21 dias de aplicação das formulações (NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4) representada em porcentagem. B - Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4.	49
Figura 23. Quantidade de colágeno na derme de suínos após 21 dias de aplicação das formulações (NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4) representada em porcentagem.	50
Figura 24. Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do NC ⁻ , NC ⁺ , OC.0,8 e OC.2,4; aumento de 400x, coloração HR.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido glicólico
ATA	Ácido tricloroacético
C⁻	Controle negativo
C⁺	Controle positivo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CL	Cristais Líquidos
DP	Desvio Padrão
EHL	Equilíbrio hidrófilo lipofílico
F.AG	Formulação de <i>peeling</i> com a substituição do fenol por ácido glicólico
F.ATA	Formulação de <i>peeling</i> com a substituição do fenol por ácido tricloroacético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HE	Hematoxilina- Eosina
HR	Herovici
MLP	Microscopia de luz polarizada
NC⁻	Controle negativo feito com Novisol [®]
NC⁺	Controle positivo feito com Novisol [®]
NOV	Novisol [®]
OC	Óleo de <i>Croton tiglium</i>
OC.0,8	Fórmula de <i>peeling</i> de fenol com 0,8% de OC e Novisol [®]
OC.2,4	Fórmula de <i>peeling</i> de fenol com 2,4% de OC e Novisol [®]
PEG-80LS	PEG-80 laurato de sorbitano
PKC	Proteína quinase C
SEP	Septisol [®]
SSOC14-16	Sulfonato de sódio olefina C14-16

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 A PELE E A PRODUÇÃO DE COLÁGENO.....	16
2.2 <i>PEELING</i> DE FENOL COM ÓLEO DE <i>C. TIGLIUM</i>	18
2.3 ÓLEO DE <i>CROTON TIGLIUM</i>	22
2.4 BUSCANDO NOVAS PROPOSTAS	23
2.4.1 ABORDAGEM 1 – SUBSTITUTOS PARA O FENOL.....	24
2.4.2 ABORDAGEM 2 – UMA POSSÍVEL ALTERNATIVA TECNOLÓGICA: CRISTAIS LÍQUIDOS	25
2.4.3 ABORDAGEM 3 – SUBSTITUIÇÃO DO SEPTISOL [®]	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 ABORDAGEM 1 – PREPARO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO AG E ATA	31
4.2 ABORDAGEM 2 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CL	32
4.2.1 PREPARO DOS SISTEMAS DE FASES TERNÁRIOS CONTENDO ÁCIDO OLEICO/ BRIJ [®] 58/ ÁGUA E ÁCIDO OLEICO+OC/ BRIJ [®] 58/ ÁGUA.....	32
4.2.2 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (MLP)	32
4.3 ABORDAGEM 3 – PREPARO DAS FORMULAÇÕES DE <i>PEELING</i> DE FENOL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OC	33
4.4 ENSAIO <i>IN VIVO</i>	33
4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	35
4.2.1 COLORAÇÃO, OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS FOTOMICROGRAFIAS	35
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 ABORDAGEM 1 – AG E ATA COMO SUBSTITUINTES DO FENOL	38
5.2 ABORDAGEM 2 – AVALIAÇÕES PRELIMINARES DOS CL	44
5.3 ABORDAGEM 3 – FORMULAÇÕES CONTENDO NOVISOL [®] E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OC	46
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	52
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE A – RESUMO GRÁFICO	61
APÊNDICE B - CHARACTERIZATION OF THE ACTIVITY OF <i>CROTON TIGLIUM</i> OIL IN HETTER’S VERY HEAVY PHENOL-CROTON OIL CHEMICAL PEELS ..	62
APÊNDICE C - DEPTH OF INJURY OF HETTER’S PHENOL CROTON OIL CHEMICAL PEEL FORMULA USING 2 DIFFERENT EMULSIFYING AGENTS...	64

APÊNDICE D - EFFECT OF INJECTION SOLUTIONS IN THE DISPERSION OF SYRINGE LUBRICANT (SILICONE OIL)	66
APÊNDICE E - FLUSH TECHNIQUE TO MINIMIZE ADVERSE REACTIONS FROM SYRINGE LUBRICANT (SILICONE OIL)	68
APÊNDICE F - CHITOSAN/NANOCELLULOSE-BASED BIONANOCOMPOSITE FILMS FOR CONTROLLED BETAMETHASONE AND SILVER SULFADIAZINE DELIVERY	70
APÊNDICE G - CYTOTOXIC BIOMONITORED STUDY OF <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i> (PAX) BRUYNS	72
APÊNDICE H - ANTI-ULCER MECHANISMS OF POLYPHENOLS EXTRACT OF <i>EUPHORBIA UMBELLATA</i> (PAX) BRUYNS (EUPHORBIACEAE).....	74

1 INTRODUÇÃO

Os ideais de uma sociedade, em uma determinada época, estabelecem os conceitos estéticos de beleza, instigando o ser humano a alcançar esses padrões. Assim, buscam-se maneiras de reduzir os danos causados pelo envelhecimento, procurando manter-se com uma aparência jovem e bela a qual irá impactar na construção de uma autoimagem mais satisfatória e na saúde psicossocial do indivíduo (SCHERER *et al.*, 2017; MARTÍNEZ-GONZÁLES; MARTÍNEZ-GONZÁLES; GUERRA-TAPIA, 2014).

Neste sentido, o *peeling* é um procedimento que, empregando substâncias cáusticas e tendo um efeito abrasivo, promove a regeneração da pele. Este dano ocorre de forma controlada, desenvolvendo um processo inflamatório o qual permite a reconstrução da região tratada, reduzindo rugas, sinais de envelhecimento, cicatrizes e danos causados pela luz solar (TORTORA; DERRICKSON, 2017; FISCHER *et al.*, 2010). Dentre as substâncias utilizadas com esta finalidade, destaca-se o fenol que, desde 1960, compõe uma formulação desenvolvida por Baker e Gordon, contendo também óleo das sementes da espécie vegetal *Croton tiglium*, uma solução contendo um tensoativo e água. Esta formulação forneceria resultados mais eficazes de cicatrização e regeneração da pele do que formulações sem este óleo (LEE *et al.*, 2018; FISCHER *et al.*, 2010; VELASCO *et al.*, 2004).

Acredita-se que os principais componentes ativos na formulação de Baker e Gordon, e outras que surgiram baseadas nela como as formulações de Hetter, estejam presentes no óleo de *C. tiglium* (OC); destacando-se os forbóis (diterpenos encontrados na constituição química desse óleo vegetal), os quais seriam capazes de desencadear o processo inflamatório. Assim, o fenol teria como função desestabilizar as camadas da derme e favorecer a permeação dos compostos da matriz vegetal e sua consequente atividade (WANG *et al.*, 2015; HETTER, 2000d).

Apesar dos bons resultados demonstrados por formulações contendo fenol, sua toxicidade é alta. Dentre os efeitos tóxicos pode ocorrer arritmia cardíaca, fibrilação atrial e ventricular, contrações ventriculares prematuras e hipotensão. Estes efeitos limitam o uso de tais produtos, exigindo do médico dermatologista cautela na execução do procedimento (KADUNC; VANTI, 2009; VELASCO *et al.*, 2004).

Outro inconveniente dessas formulações é o fato de serem altamente instáveis, ocorrendo separação dos componentes em poucos minutos, apesar de utilizar o Septisol[®], que na formulação teria a função de agir como um tensoativo, uma substância capaz de promover a homogeneidade de sistemas que contém compostos com diferentes polaridades (KASS;

RULLAN; BRODY, 2020). Esta instabilidade pode prejudicar o tratamento e interferir nos resultados obtidos nos pacientes (JUSTO *et al.*, 2020; NEITZKE *et al.*, 2020). Apesar disso, o Septisol[®] foi utilizado por muitos anos, até que em 2019 novas normas do *Food and Drug Administration* (FDA) levaram à suspensão da sua produção e, por conseguinte, sua substituição por Novisol[®] (NEITZKE *et al.*, 2020).

Neste contexto, surge a necessidade de desenvolver e investigar produtos menos tóxicos e que explorem de uma maneira mais adequada o potencial ativo do OC, bem como avaliar a retirada do fenol da formulação. Além disso, vêm à tona questionamentos sobre as implicações acarretadas pela substituição do componente da fórmula responsável pela sua estabilidade (Septisol[®]), uma vez que a características de estabilidade e efetividade da fórmula podem ser profundamente afetadas.

Tratando-se de *peeling* químico, diversos agentes são empregados como, por exemplo: o ácido tricloroacético e o ácido glicólico, cujos efeitos dermatológicos são semelhantes ao do fenol (em baixas concentrações) e que apresentam menor toxicidade (TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016). Apesar disso, estes componentes ainda não foram avaliados em formulações contendo o OC como substituintes do fenol.

Outra abordagem para otimizar a administração tópica de ativos naturais são os cristais líquidos, por serem sistemas estáveis e possibilitarem outras características como viscosidade adequada, mucoadesão, liberação modificada e permeação cutânea (RAPALLI *et al.*, 2020; HYDE, 2001). Boa parte dos trabalhos que desenvolvem CL empregando materiais vegetais não os tem como componente ativo e sim como fase oleosa que integra o sistema, sendo um potencial ainda pouco explorado (BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

Ainda, o surgimento de uma fórmula estável, a partir do uso de Novisol[®] permite investigar o efeito da variação do OC em preparações contendo fenol sem a interferência da separação de fases (JUSTO *et al.*, 2020; LARSON; KARMO; HETTER, 2009).

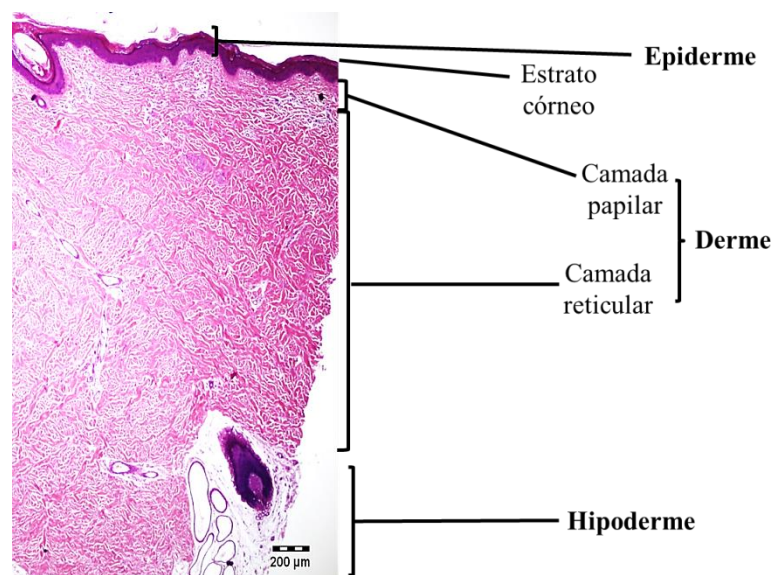
Considerando este cenário, o presente trabalho pretendeu explorar o potencial dos componentes presentes nas formulações de *peeling* profundo derivadas da fórmula de Hetter, considerando o OC como principal componente ativo e buscando minimizar a toxicidade da fórmula principalmente em relação ao fenol. Para tanto, seguindo três abordagens distintas, foram estudadas formulações a fim de determinar sua efetividade em estimular a produção de colágeno enquanto produto dermatológico e, na sequência, propor caminhos mais favoráveis para o desenvolvimento e a caracterização de novas formulações tecnologicamente elaboradas, contendo OC, para serem empregadas nos procedimentos dermatológicos de *peeling* em clínicas médicas de modo seguro, eficaz e reprodutível.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PELE E A PRODUÇÃO DE COLÁGENO

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, em superfície e peso, e apresenta como função principal a proteção contra perda de água, além da proteção contra agentes nocivos, como por exemplo, microrganismos (LEONARDI; MATHEUS, 2005). É também o órgão mais exposto e de observação mais fácil tanto para sinais de desequilíbrios internos quanto disfunções limitadas a ela (TORTORA; DERRICKSON, 2017). Compõe o sistema tegumentar juntamente com glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, folículos pilosos, unhas e receptores sensoriais (TORTORA; DERRICKSON, 2017; GARTNER; HIATT, 2007). Consiste em duas camadas distintas: a epiderme e a derme; tendo logo abaixo a hipoderme ou camada subcutânea (**Figura 1**) (TORTORA; DERRICKSON, 2017).

Figura 1. Fotomicrografia – representação das camadas da pele de suíno (corado com hematoxilina-eosina, capturado em aumento de 40x).



Fonte: A autora.

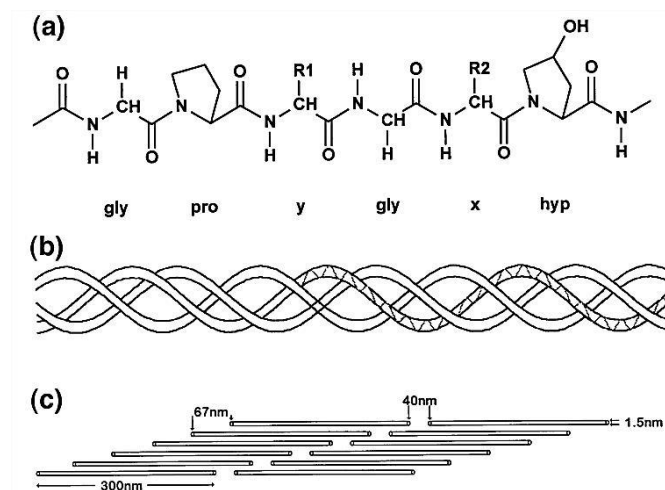
A epiderme é constituída de epitélio escamoso estratificado queratinizado apresentando cerca de 90% de queratinócitos, além de melanócitos, macrófagos e células epiteliais táteis (células de Merkel, mecanorreceptores e termorreceptores). Os queratinócitos podem se organizar em 4 ou 5 camadas, ou estratos, em diferentes estágios de desenvolvimento. O estrato córneo, camada mais superficial de pele, é constituído por células mortas e achatadas com grande acúmulo de queratina e apresenta-se como a principal barreira

para a absorção de princípios ativos pela via tópica. A permeação de princípios ativos pela pele pode ocorrer principalmente de modo transcelular, através das células, ou paracelular, nos espaços intercelulares (GEUSENS *et al.*, 2011).

A derme protege e confere apoio para vasos sanguíneos, nervos e estruturas anexas, sendo composta majoritariamente de colágeno (SOUTOR; HORDINSKY, 2017). Na derme encontram-se também os fibroblastos, responsáveis por produzir colágeno, elastina e constituintes da matriz extracelular amorfa.

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e está presente em diversos tecidos como nos ossos, cartilagens, tendões e pele. Sua molécula é estruturalmente composta de 3 cadeias polipeptídicas organizadas de tal modo a permitir a formação de uma tripla-hélice (**Figura 2**).

Figura 2. Estrutura química do colágeno tipo I. a) Cadeia polipeptídica; b) Enovelamento da tripla-hélice; c) Microfibrilas.



Fonte: Friess, 1998.

Os diferentes sequenciamentos dos aminoácidos glicina, prolina, hidroxiprolina e hidroxilisina geram diferentes tipos de colágeno, sendo as duas últimas responsáveis por alinhar e estabilizar a tripla-hélice (VOET; VOET; PRATT, 2014; FRANZEN; SANTOS; ZANCANARO, 2013). Esta conformação é chamada de tropocolágeno, na qual as três cadeias se entrelaçam e se estabilizam por ligações de hidrogênio que conferem a força tênsil característica desta proteína (VOET; VOET; PRATT, 2014). Estas moléculas se ligam a outras formando microfibrilas, fibrilas e fibras de colágeno progressivamente (VOET; VOET; PRATT, 2014).

Os principais tipos de colágenos presentes na pele são tipo I e tipo III, sendo o segundo em menor quantidade. O colágeno tipo I possui diâmetro entre 1 e 20 μm e é encontrado principalmente na derme reticular (camada mais profunda), enquanto o colágeno tipo III apresenta diâmetro entre 0,5 a 5 μm e se encontra principalmente na derme papilar (camada mais superficial) (ISAAC *et al.*, 2010).

2.2 PEELING DE FENOL COM ÓLEO DE *C. tiglium*

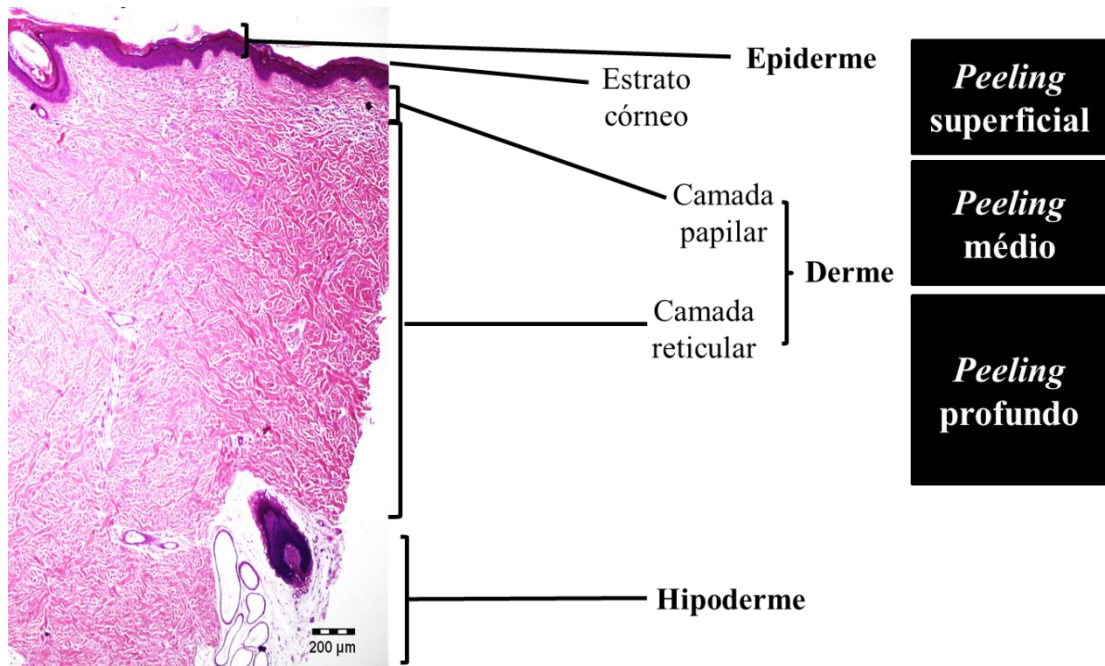
Com o processo de envelhecimento ocorrem diversas mudanças nas características morfológicas e fisiológicas da pele, que podem ser decorrentes de fatores intrínsecos e/ou extrínsecos. Algumas dessas mudanças observadas em pessoas idosas são: a redução significativa da espessura da epiderme e da derme, a diminuição da superfície de contato epiderme-derme resultado da fragmentação e compactação das fibras elásticas com a perda do padrão de distribuição reticular, diminuição da matriz dérmica, redução do número de fibroblastos e consequentemente da produção de colágeno e elastina, aumento da degradação de colágeno, entre outras (BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019; RUIVO, 2014; VOET; VOET; PRATT, 2014; MENOITA; SANTOS; SANTOS, 2013). Estas alterações tornam-se mais relevantes ao considerar o constante e crescente aumento da expectativa de vida, que também intensificou a busca pela beleza e manutenção da juventude, destacando-se a procura por manter a pele jovem e bonita.

Com isso tem ocorrido um importante avanço nos tratamentos dermatológicos, bem como o estabelecimento de novos procedimentos não invasivos, uma vez que a busca por abordagens cirúrgicas têm diminuído (PATHAK; MOHAN; ROHRICH, 2020; MARTÍNEZ-GONZÁLES; MARTÍNEZ-GONZÁLES; GUERRA-TAPIA, 2014). Uma das técnicas utilizadas para reverter alguns danos causados na pele em decorrência do fotoenvelhecimento, marcas e cicatrizes é o *peeling* químico, denominado também como *resurfacing* químico, quimiocirurgia e quimioesfoliação (FISCHER *et al.*, 2010; KADUNC; VANTI, 2009). Este procedimento se baseia na aplicação de uma substância cáustica sobre a pele (com marcas e sinais de envelhecimento) que irá promover a esfoliação profunda e controlada da pele, instigando a renovação celular e, assim, regenerando o tecido, o qual irá adquirir uma aparência mais jovem (BAGATIN; HASSUN; TALARICO, 2009; VELASCO *et al.*, 2004).

Diversos agentes químicos isolados ou em associações podem ser utilizados para realização de procedimentos de *peelings*, como o ácido glicólico e seus derivados, ácido salicílico, ácido tricloroacético, resorcina e fenol. Dependendo da formulação a qual eles

compõem e sua concentração, podem atingir diferentes camadas na pele, sendo classificados como *peeling* superficial, médio ou profundo (**Figura 3**) (WEISSLER *et al.*, 2017; TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016; YOKOMIZO, 2013).

Figura 3. Ilustração dos tipos de *peeling* de acordo com as camadas da pele de suíno.



Fonte: A autora.

Nota: Fotomicrografia obtida no aumento de 40x, coloração HE.

O *peeling* superficial pode ser dividido em dois tipos, um atingindo a profundidade máxima de 100 µm, outro agindo entre 100 e 200 µm. Estas formulações atuam no estrato córneo e na epiderme apenas, como o ácido salicílico e o ácido retinoico. Os *peelings* classificados como médios exercem ação a uma profundidade entre 200 e 400 µm, afetando, assim, além do estrato córneo e da epiderme, a derme papilar (obrigatoriamente) e podendo ou não atingir o início da derme reticular, como é o caso do ácido tricloroacético a 35% e o ácido pirúvico a 40%. Enfim, os *peelings* profundos, como são os casos dos procedimentos que usam a fórmula de Baker-Gordon ou de Hetter, penetram mais de 400 µm, exercendo atividade em todas as camadas da pele. Além dessas formulações, o uso de fenol 88% e de ácido tricloroacético em concentrações maiores que 50% também são classificados como *peeling* profundo (WEISSLER *et al.*, 2017; TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016).

Conforme os objetivos do tratamento e a intensidade das marcas e/ou sinais a serem tratados, faz-se a escolha do tratamento, pois quanto maior a profundidade dos danos que o tratamento causa, melhores e mais duradouros são os resultados, mas também maiores os

riscos de complicações como infecções, formação de manchas e marcas (WEISSLER *et al.*, 2017; TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016).

Dentre os *peelings* químicos profundos, um dos mais clássicos é a formulação de Baker-Gordon (**Tabela 1**), a qual atinge a derme reticular, sendo utilizado para tratar lesões acentuadas e sinais de envelhecimento (BAGATIN; HASSUN; TALARICO, 2009).

Tabela 1. Fórmulas de Hetter e Baker-Gordon.

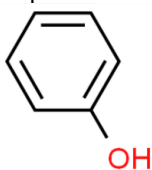
	Fórmula de Hetter	Fórmula de Baker-Gordon
Componentes	% p/p	% p/p
Fenol (88%)	35	49,3
Água destilada	58,4	46
OC	1,6	2,1
Septisol®	5	2,6

Fonte: A autora.

Baker e Gordon desenvolveram sua fórmula empregando o fenol, associado ao óleo de *Croton tiglium* (OC), água e Septisol® (FISCHER *et al.*, 2010). Apesar de essa fórmula ser utilizada há muitos anos, ela apresenta alta toxicidade cardíaca e renal como apontam diversos trabalhos (WEISSLER *et al.*, 2017; KANDUNC; VANTI, 2009; LANDAU, 2007). Hetter (2000d) avaliou a desconstrução da fórmula de Baker-Gordon e sugeriu que o agente responsável pela ação esfoliante seriam os compostos presentes no OC. Atualmente a fórmula aperfeiçoada por Hetter (2000a,b,c,d) (**Tabela 1**) e suas derivações são as mais utilizadas na clínica, mesmo com as diferentes técnicas e produtos que têm sido desenvolvidos nos últimos anos (WEISSLER *et al.*, 2017).

O fenol é um álcool aromático (**Figura 4**) com característica de ácido fraco e seus efeitos na pele consistem em toxicidade direta nas proteínas celulares e proteínas de membrana, além de inativação enzimática.

Figura 4. Estrutura química do fenol.



Fonte: ChemSpider - <http://www.chemspider.com>

Ele começou a ser empregado por leigos para tratar cicatrizes e sinais de envelhecimento após a Primeira Guerra Mundial, embora os resultados do seu uso tenham sido divulgados a partir da década de 1940. Porém, foi apenas a partir da década de 1960, com as formulações de Baker e Gordon que seu uso se popularizou entre os médicos. Assim como tantos outros agentes empregados no *peeling* químico, seus efeitos variam de acordo com a concentração utilizada. Ao aplicar soluções a 88% de fenol ocorre a imediata coagulação da queratina presente na epiderme e sua penetração fica limitada à camada reticular da derme, enquanto que diluições entre 45% e 55% de fenol apresentam efeito queratolítico e permite uma maior profundidade de penetração (PATHAK; MOHAN; ROHRICH, 2020; GOH; LIM; 2016; TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016; FISCHER *et al.*, 2010).

Além de doloroso, *peelings* que utilizam fenol possuem riscos cardíacos e possíveis toxicidades hepática e renal (TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016). Ao ocorrer absorção sistêmica (após atingir a derme), o fenol é metabolizado pelo fígado, majoritariamente conjugado com ácidos glicurônico ou sulfúrico, sendo então excretados pelos rins. Este processo leva cerca de quinze minutos, sendo assim, em pacientes que demonstrem sinais imediatos de intoxicação como arritmia cardíaca, náusea e dor de cabeça, é possível modular os riscos realizando pausas de pelo menos vinte minutos entre aplicações em diferentes áreas (CHISAKI; HORN; NORIEGA, 2016; GOH; LIM; 2016; YOKOMIZO, 2013; TRUPPMAN, 1979).

Alcalinizar a urina (visando acelerar a excreção), combinar diferentes agentes químicos alternadamente, ou ainda, empregar formulações que associem adjuvantes capazes de aumentar sua eficácia e segurança, como tensoativos (fórmulas de Baker-Gordon e de Hetter), são as alternativas presentes nas formulações utilizadas nos consultórios médicos em todo o mundo (CHISAKI; HORN; NORIEGA, 2016; BRODY, 1997).

Apesar da fórmula de Baker-Gordon ter se popularizado na comunidade médica tendo o fenol como principal agente ativo, em 2000, Hetter publicou uma série de artigos avaliando variações desta formulação contendo diferentes quantidades de OC e menor concentração de fenol, colocando em foco o OC como principal ativo da formulação (PATHAK; MOHAN; ROHRICH, 2020; HETTER, 2000a; HETTER, 2000b; HETTER, 2000c; HETTER, 2000d).

2.3 ÓLEO DE *Croton tiglium*

A espécie *C. tiglium* é pertencente à família *Euphorbiaceae* e conta com cerca de 290 gêneros distribuídos principalmente em regiões tropicais (HIROTA *et al.*, 2010). Dentre esses, se sobressai o gênero *Croton*, englobando aproximadamente 1.300 espécies, as quais algumas são utilizadas principalmente para efeitos analgésico e anti-inflamatório e para o tratamento de câncer (ZHANG *et al.*, 2015b). A espécie *C. tiglium* é comum nas regiões tropicais da Ásia e seu fruto é muito utilizado no tratamento de distúrbios gastrointestinais e inflamatórios (KIM *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2012; TSAI; TSAI; CHANG, 2004). O principal produto extraído desse fruto é o óleo, o qual tem sua aplicação em formulações de *peeling* como a de Baker-Gordon e as de Hetter, muito difundida no ramo da dermatologia.

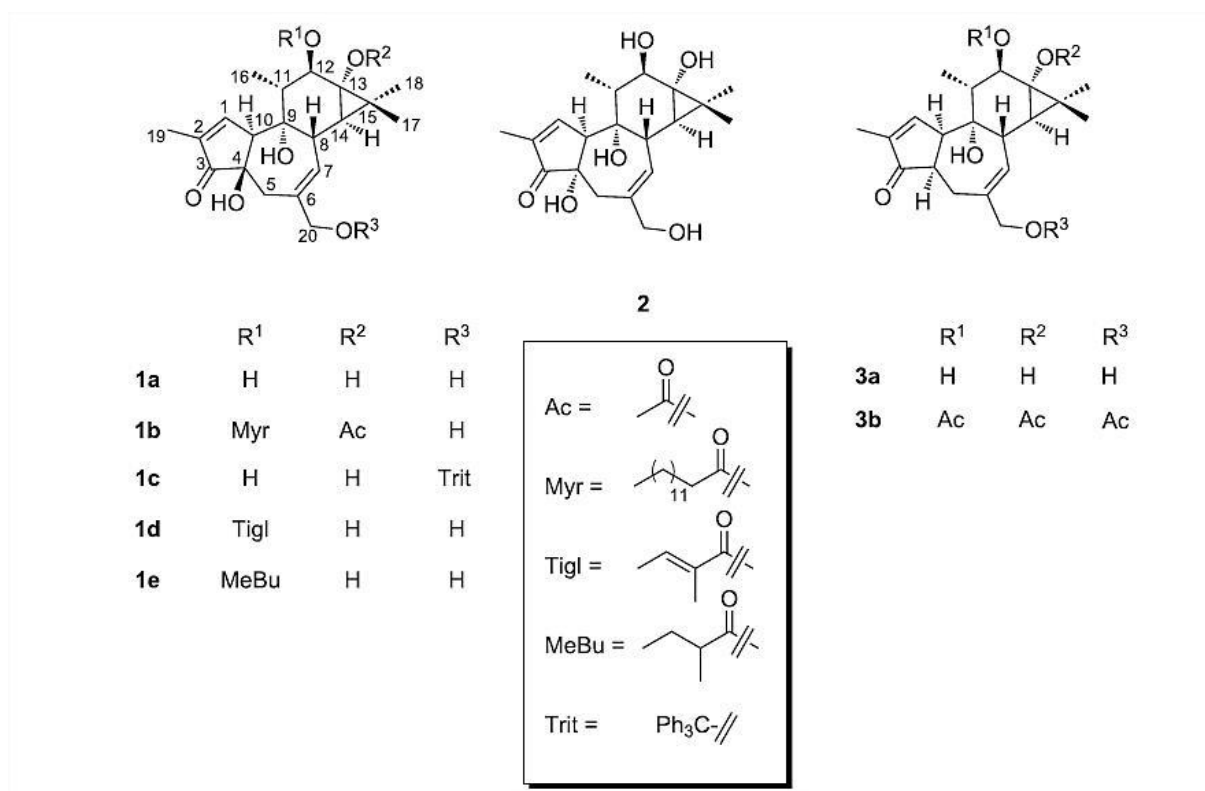
Na literatura podem-se encontrar diversas proposições a respeito das funções do OC no *peeling* profundo, porém sua atividade biológica nestas formulações ainda não foi claramente demonstrada. Dentre as atribuições sugeridas está o carreamento do fenol, permitindo uma ação profunda na derme, tendo ele um papel secundário no *peeling* (Stone, 1998). Por outro lado, Hetter sugere que os compostos químicos presentes no OC são os componentes fundamentais para os ótimos resultados encontrados na clínica, possuindo papel primordial para a obtenção do efeito desejado, mesmo em concentrações baixas. Buscando esclarecer a contribuição do óleo, avaliaram-se diferentes formulações variando a concentração de fenol e OC e constatou que reduzindo a porcentagem de fenol e elevando a de óleo, na formulação, a quimioesfoliação era mais eficaz (PATHAK; MOHAN; ROHRICH, 2020; HETTER, 2000a; HETTER, 2000b; HETTER, 2000c; HETTER, 2000d).

Os diterpenos são metabólitos químicos comumente presentes em espécies da família *Euphorbiaceae*, nos quais o núcleo principal apresenta vinte carbonos. Dentro dessa classe, destacam-se os ésteres de forbóis (diterpenos característicos) (**Figura 5**), dos quais alguns apresentam atividade citotóxica contra tumores, anti-HIV, ativação da proteína quinase C (PKC) entre outras ações (KIM *et al.*, 2014). Os ésteres de forbóis são metabólitos tóxicos, os quais dependendo da dose e do tipo do núcleo central podem ter atividade antitumoral ou pró-cancerígena, anti-inflamatória ou pró-inflamatória. São substâncias lipossolúveis, o que favorece sua extração a partir dos óleos de muitas espécies, como é o caso do OC (HIROTA *et al.*, 2010).

Estando, a partir disso, o OC em evidência, pesquisas começaram a ser realizadas a fim de determinar sua constituição química, os agentes biológicos e, então, elucidar os mecanismos que fazem dele um elemento fundamental para o *peeling* profundo. Seus

constituintes majoritários são os ácidos graxos como o ácido oleico, linoleico e eicosanoico, porém os que têm maior interesse biológico são os diterpenos (ZHANG *et al.*, 2015a; KIM *et al.*, 2014). Alguns diterpenos foram identificados e chamados de forbóis de OC já em 1930, suscitando a possibilidade de serem os responsáveis pela ação pró-inflamatória (FLASHENTRÄGER, 1930 *apud* JUSTO, 2018). Sabe-se que os ésteres de forbois são substâncias altamente tóxicas, o que levou ao desenvolvimento de diversas pesquisas voltadas principalmente ao efeito em linhagens cancerosas (ZHANG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2013; GOEL *et al.*, 2007). Além disto, o isolamento e identificação destas substâncias continuam em destaque e, ao longo dos anos, vários estudos descreveram diferentes ésteres de forbóis presentes no OC (**Figura 5**) (PAGANI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2013).

Figura 5. Os principais diterpenos polióis do óleo de Croton [forbol (1a), 4 α -forbol (2), 4-desoxi-4 α -forbol (3a)].



Fonte: Pagani *et al.* (2017).

2.4 BUSCANDO NOVAS PROPOSTAS

O Brasil possui uma grande biodiversidade, bem como um notável potencial botânico, contando com cerca de 42.000 – 55.000 espécies vegetais (PORTAL BRASILEIRO DE

DADOS ABERTOS, 2020; CALIXTO, 2019; IMCBIO, 2019; SiBBR, 2019; JOLY *et al.*, 2019). Nas últimas décadas, observou-se um crescente número nas publicações científicas envolvendo espécies vegetais, porém, o registro e comercialização de produtos empregando ativos naturais ainda é pequeno no país (CALIXTO, 2019; JUNIOR *et al.*, 2014).

Apesar das formulações de *peeling* de fenol com OC serem utilizadas há mais de 60 anos na dermatologia, não existe um produto comercial de nenhuma delas. A manipulação é feita pelo próprio médico pouco tempo antes da aplicação e a mistura não apresenta estabilidade adequada, devendo ser homogeneizada a cada aplicação (JUSTO *et al.*, 2020; WAMBIER *et al.*, 2019; STONE; LEFER, 2001). Isto faz com que a segurança e a eficácia do tratamento possam ser comprometidas, podendo haver complicações como o surgimento de cicatrizes e aumento de risco de intoxicação por fenol (alterações cardíacas) (JUSTO *et al.*, 2020; TRUPPMAN, 1979).

Somado a estes fatores, as novas normas do FDA (2019) proibiram o uso de triclosan em desinfetantes para as mãos, que era um dos constituintes do Septisol[®] (utilizado nas fórmulas de Baker-Gordon e de Hetter), sendo sua produção descontinuada e levando os dermatologistas a procurarem um substituto (JUSTO *et al.*, 2020; BAKER, 1962). Neste cenário, faz-se indispensável a busca e avaliação de formulações para *peeling* que explorem o potencial do OC de maneira estável, segura e eficaz. Para tanto, este trabalho seguiu três possíveis abordagens: a substituição do fenol (abordagem 1), o desenvolvimento de cristais líquidos (abordagem 2) e a substituição do Septisol[®] (abordagem 3).

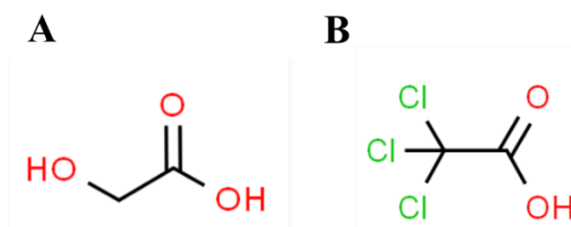
2.4.1 Abordagem 1 – Substitutos para o Fenol

O ácido glicólico (AG - **Figura 6 A**) pode ser empregado como *peeling* superficial ou profundo. Em baixas concentrações (5% a 10%), causa o destacamento de queratinócitos, diminuindo a compactação do estrato córneo, reduz a aderência dos queratinócitos, favorecendo a absorção de outros componentes, e epidermólise (TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016; YOKOMIZO, 2013). Sua baixa acidez não permite que ocorra a coagulação adequada das proteínas, sendo sua atividade mais estimulatória do que destrutiva, ao contrário do fenol e do ácido tricloroacético. As concentrações mais utilizadas são 30% e 70% e a profundidade da penetração está relacionada ao pH da formulação, apesar do tamanho reduzido das moléculas facilitar este processo (GOH; LIM, 2016). Podem-se associar procedimentos com AG (70%), seguido de lavagem com água e aplicação de ácido tricloroacético (35%), com o objetivo de atingir uma profundidade média de modo mais

seguro do que a aplicação de concentrações mais elevadas de ácido tricloroacético isoladamente (GOH; LIM, 2016).

O ácido tricloroacético (ATA - **Figura 6 B**) é um agente químico capaz de ser empregado nos três diferentes níveis de *peeling*. Na concentração de 10% o efeito é superficial, entre 10% e 30% atinge a classificação média e, por fim, ao ser utilizado em concentrações de 35% a 50% classifica-se como *peeling* profundo, porém concentrações acima de 35% podem gerar cicatrizes. Sua ação característica é induzir a necrose coagulativa de proteínas e células (WEISSLER *et al.*, 2017; GOH; LIM, 2016; TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016). O uso deste agente químico é quase tão antigo quanto o fenol, sendo descrito como agente de *peeling* profundo pouco mais de cem anos depois do início do uso do fenol (WEISSLER *et al.*, 2017). Embora sua ação e os resultados produzidos por este agente sejam semelhantes ao fenol, sua toxicidade é consideravelmente menor, o que o torna mais seguro (WEISSLER *et al.*, 2017; GOH; LIM, 2016; TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016).

Figura 6. Estrutura química do ácido glicólico - A (AG) - e do ácido tricloroacético - B (ATA).



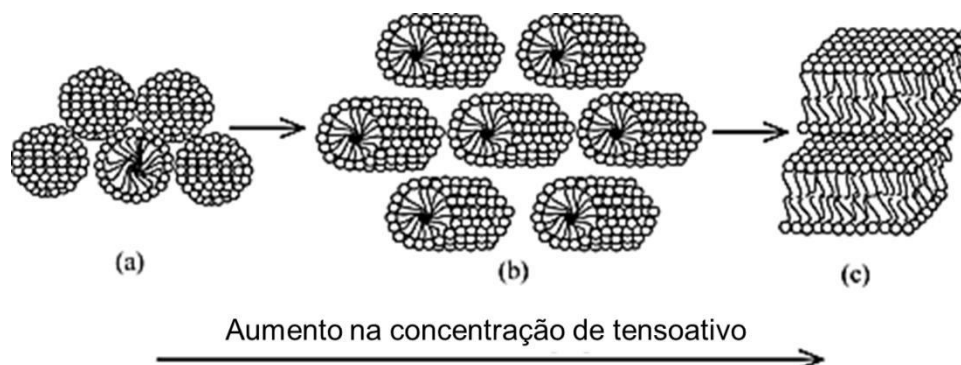
Fonte: ChemSpider - <http://www.chemspider.com>

2.4.2 Abordagem 2 – uma Possível Alternativa Tecnológica: Cristais Líquidos

Os cristais líquidos (CL), também chamados de mesofases, são estados intermediários da matéria que se caracterizam pela parcial ordem e desordem das moléculas (fases fluida ordenada). Apresentam propriedades óticas típicas do estado cristalino (isotropia e anisotropia – tendência direcional, birrefringência – reação à polarização) e a fluidez característica do estado líquido. Estas características fazem com que este tipo de material seja de grande interesse para incorporação de substâncias ativas, por facilitar a administração e absorção, controlando a sua liberação, entre outros benefícios (OYAFUSO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; HYDE, 2001; SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

Podem ser classificados como termotrópicos ou liotrópicos, sendo as mesofases hexagonal, lamelar e cúbica pertencentes ao último tipo (FORMARIZ *et al.*, 2005; HYDE, 2001). A organização das moléculas ocorre de maneira espontânea e varia de acordo com a concentração de tensoativo (**Figura 7**) (OTTO; PLESSIS; WIECHERS, 2009; HYDE, 2001).

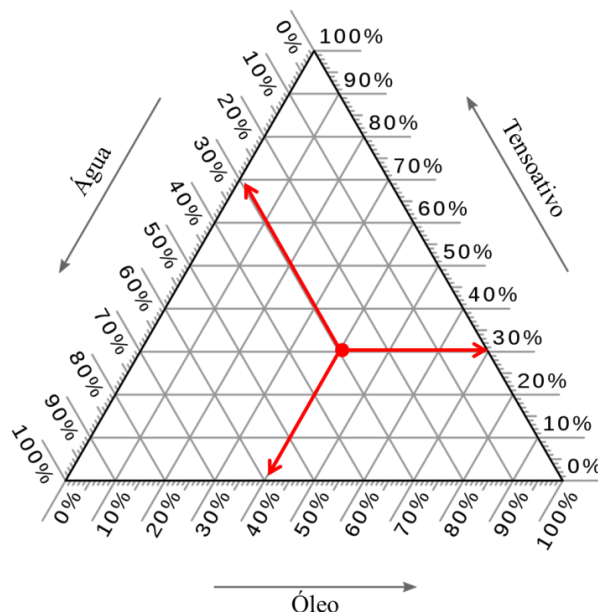
Figura 7. Esquema da transição dos CL liotrópicos: (a) fase cúbica, (b) fase hexagonal e (c) fase lamelar.



Fonte: Adaptado de Otto, Plessis, Wiechers, 2009.

Os CL liotrópicos têm sido muito avaliados em formulações que visam à administração tópica de ativos naturais, principalmente em sistemas ternários (OLIVEIRA *et al.*, 2021; OYAFUSO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2016). Estes sistemas são, normalmente, constituídos por: uma fase aquosa, uma fase oleosa e um tensoativo (MALMSTEN, 2002). A sua formação pode ser ilustrada a partir de diagramas de fases (**Figura 8**), o qual é único e varia de acordo com a combinação de componentes escolhida. Cada ponto de interpolação no diagrama é referente a uma formulação com diferentes concentrações dos três componentes do sistema, podendo ter diferentes características físicas (MALMSTEN, 2002; HYDE, 2001).

Figura 8. Modelo de diagrama de fases ternário indicando a composição: 30% de tensoativo, 40% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.



Fonte: A autora.

Diversos usos dos CL têm sido avaliados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, desde seu potencial como veículo em formulações de administração tópica pela sua viscosidade, estabilidade e possível capacidade mucoadesiva, até como meio de facilitar e promover a permeação cutânea de fármacos, sistemas de liberação modificada, entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2021; RAPALLI *et al.*, 2020; FORMARIZ *et al.*, 2005; HYDE, 2001).

Dentre esses estudos, alguns exploram o potencial dos ativos naturais, como o trabalho de Silva e colaboradores (2017) que estudaram o efeito anti-inflamatório do chá verde (*Camellia sinensis*) em sistemas formados por água, PPG-5-Ceteth-20 (**Figura 9**) e óleo de abacate. No entanto, maioria das pesquisas com CL envolvendo matérias-primas vegetais avaliam apenas sua função como componente do sistema ternário (fase oleosa) e não seu potencial terapêutico (BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

mistura mais homogênea, até que, em 2009, Larson, Karmo e Hetter realizam um estudo no qual investigaram a contribuição de cada componente do *peeling* em modelo experimental suíno. Eles testaram 40 soluções diferentes, divididas em 8 grupos, chegando a conclusões importantes. De acordo com esse trabalho, o Septisol[®] contribui para o aumento da profundidade do *peeling*, além de uma resposta inflamatória mais rápida, mas não de maneira direta. Os pesquisadores sugerem que ocorre a redução da tensão superficial do fenol permitindo sua penetração profunda antes da desnaturação proteica. Sendo assim, evidenciou-se que para obter melhores resultados em *peelings* de fenol com OC se faz importante a presença de um terceiro componente, o Septisol[®] (tensoativo).

Em 2019, ocorreu uma atualização das normas do FDA para desinfetantes para as mãos, proibindo o uso de triclosan; dessa forma a produção de Septisol[®] foi descontinuada e surgiu a necessidade imediata de buscar um substituto adequado (JUSTO *et al.*, 2020; KASS; RULLAN; BRODY, 2020; FDA, 2019). Neste contexto, alguns pesquisadores vêm testando um possível substituto, o Novisol[®], o qual possui em sua composição água, PEG-80 laurato de sorbitano, álcool benzílico, etilhexilglicerina e hidróxido de amônio (JUSTO *et al.*, 2020; KASS; RULLAN; BRODY, 2020). De acordo com Kass, Rullan e Brody (2020), essa substituição não gerou os mesmos efeitos, sendo as aplicações feitas com o novo componente inferiores quando comparados ao Septisol[®]; então foi recomendado adequar a quantidade de produto aplicado bem como a técnica, ou ainda a concentração de OC. Esses autores sugerem que a redução dos efeitos é decorrente de uma redução da profundidade de penetração dos ativos, hipótese que foi refutada por Justo e colaboradores (2020), que demonstraram que formulações com as mesmas concentrações de fenol, OC e Novisol[®]/Septisol[®], com a mesma técnica de aplicação, atingiram profundidades diferentes, sendo que a formulação com Novisol[®] teve a maior profundidade. Além disso, a mistura contendo Novisol[®] demonstrou-se mais estável, o que pode proporcionar resultados mais confiáveis, uniformes e seguros para os pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e testar novas formulações de *peeling* profundo a partir do referencial da fórmula de Hetter "*very heavy*", contendo como principal ativo o óleo da semente de *Croton tiglium* (OC) e tendo como foco o aumento da segurança dos tratamentos, bem como o acréscimo de uniformidade e confiabilidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar formulações contendo OC com ácido glicólico (AG) ou ácido tricloroacético (ATA) em substituição ao fenol.
- Preparar e selecionar formulações de cristais líquidos (CL) inertes a partir de um sistema ternário de ácido oleico/PPG-5-CETETH-20 (Brij[®]58)/ água.
- Preparar e selecionar formulações de CL ativos a partir de um sistema ternário de ácido oleico+OC/PPG-5-CETETH-20 (Brij[®]58)/ água.
- Utilizar a microscopia de luz polarizada (MLP) para caracterizar as fases hexagonal e lamelar dos CL e escolher as formulações para o ensaio *in vivo*.
- Testar e avaliar diferentes concentrações de OC a partir da fórmula de Hetter "*very heavy*" contendo Novisol[®] (NOV) em substituição ao Septisol[®] (SEP).
- Avaliar a presença de colágeno, células e substância fundamental nos tempos 1, 7 e 21 dias após aplicação das formulações em coloração Hematoxilina-Eosina (HE).
- Diferenciar colágeno tipo I e tipo III pela coloração Herovici (HR) após 21 dias da aplicação das formulações.
- Propor substituições nas formulações e apontar as melhores abordagens para explorar o potencial do OC em formulações de *peeling*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ABORDAGEM 1 – PREPARO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO AG E ATA

As formulações utilizadas para todos os experimentos foram preparadas a partir de informações contidas em Hetter (2000). Antecedendo a manipulação da formulação proposta por Hetter, foi preparada uma solução estoque contendo 1,6% de OC (Delasco, USA) e 98,4% de solução aquosa de fenol a 88% (Amanda Manipulações, Ponta Grossa, Brasil) (solução estoque – *home-made*). Posteriormente foi preparada uma nova fórmula contendo 40% da solução estoque, 55% de água e 5% de SEP (Steris Corp, USA), sendo esta designada por controle positivo (fórmula de Hetter – C⁺). O controle negativo (C⁻) foi preparado misturando-se 95% de água e 5% de SEP. Para o preparo das formulações contendo ácido glicólico (AG) e ácido tricloroacético (ATA), foi realizada uma mistura com as mesmas proporções do preparo do controle positivo, substituindo a quantidade de fenol, pela mesma quantidade de AG (F.AG) (70%, Biotec[®], Brasil) e ATA (F.ATA) (40%, Delasco, USA) em suas respectivas fórmulas (**Tabela 2**).

Tabela 2. Formulações utilizadas nos ensaios.

Formulação	Componentes	(% p/p)
(C⁻)	Água	95
Controle negativo	SEP	5
(C⁺)	Água	55
Controle positivo	SEP	5
Formulação de Hetter	Solução estoque	40
(F.AG)	Água	58,4
Substituição do fenol por AG	SEP	5
	OC	1,6
	AG	35
(F.ATA)	Água	58,4
Substituição do fenol por ATA	SEP	5
	OC	1,6
	ATA	35

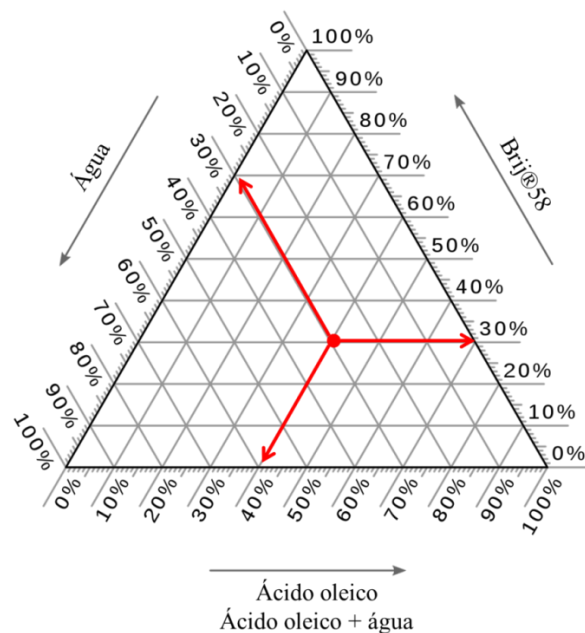
Fonte: A autora.

4.2 ABORDAGEM 2 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CL

4.2.1 Preparo dos Sistemas de Fases Ternários Contendo Ácido Oleico/ Brij®58/ Água e Ácido Oleico+OC/ Brij®58/ Água

Os sistemas foram testados a partir de 36 amostras feitas variando a concentração dos três componentes de 10% a 80% (p/p) de acordo com o diagrama da **Figura 11**.

Figura 11. Diagrama de fases ternário indicando a composição: 30% de Brij®58, 40% de fase oleosa e 30% de fase aquosa.



Fonte: A autora.

Nota: cada ponto de intersecção dos três componentes (parte interna do triângulo), é referente à proporção de uma das 36 amostras.

Após a pesagem dos componentes, os sistemas foram homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro e mantidos em repouso e ao abrigo da luz por 24 h ou até que não houvesse mais bolhas. As amostras foram classificadas visualmente quanto a sua homogeneidade (separação de fases ou homogêneo), aspecto (opaco, límpido ou leitoso) e viscosidade (de fluido até muito viscoso).

4.2.2 Caracterização por Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

A caracterização das amostras foi realizada 24 h após o seu preparo utilizando um microscópio de luz polarizada Olympus® BX51. Para isso, uma pequena quantidade (cerca de

uma gota) de amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro e coberta com uma lamínula, observadas e fotografadas. As fotomicrografias foram utilizadas para identificar e classificar as amostras quanto ao tipo de organização da mesofase: hexagonal ou lamelar (anisotrópicas) ou cúbica (isotrópica).

4.3 ABORDAGEM 3 – PREPARO DAS FORMULAÇÕES DE *PEELING* DE FENOL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OC

Estas amostras foram preparadas no dia do ensaio *in vivo*, a partir das informações contidas em Hetter (2000d), substituindo o SEP pelo NOV, na mesma concentração e tendo diferentes concentrações de OC, de acordo com a **Tabela 3**. O controle positivo (NC⁺) teve como base a fórmula de Hetter “*very heavy*”, enquanto que o controle negativo (NC⁻) consistiu em uma mistura de 95% de água e 5% de NOV.

Tabela 3. Formulações para avaliação do peeling de fenol com OC, substituindo Septisol[®] por Novisol[®].

	NC ⁻	NC ⁺	OC.0,8	OC.2,4
Componentes	(% p/p)			
Fenol (88%)	0	35	35	35
Água destilada	95	58,4	59,2	57,6
OC	0	1,6	0,8	2,4
NOV	5	5	5	5

Fonte: A autora.

4.4 ENSAIO *IN VIVO*

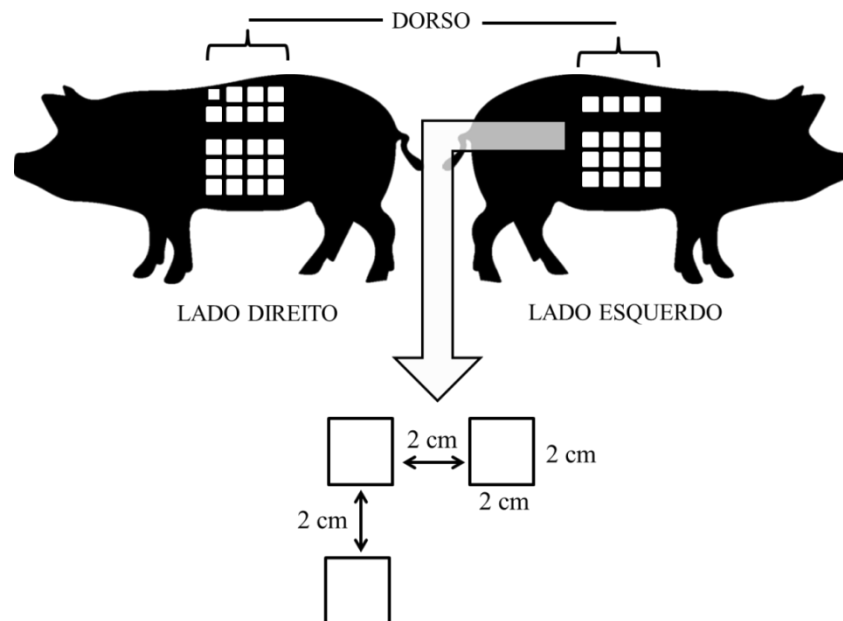
Para a avaliação biológica das formulações optou-se pela utilização do modelo suíno, pela semelhança da estrutura da pele com a pele humana e acompanhando estudos já descritos na literatura (Larson, Karmo, Hetter, 2009; Hetter, 2000d; Swindle, Hepburn, 1988). O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) através do processo 034/2017 e aprovado de acordo com o protocolo 16590/2017.

Foram utilizados quatro animais com pele despigmentada, sendo duas fêmeas e dois machos, com idade entre 4 e 5 meses, pesando entre 30 e 35 Kg. O procedimento foi baseado

no trabalho de Larson, Karmo e Hetter (2009), com adaptações. Os animais foram tranquilizados previamente com acepromazina 0,4 mg/Kg, cetamina 14 mg/Kg e xilazina 0,2 mg/Kg via intramuscular e mantidos inconscientes com propofol 5 mg/Kg pela via intravenosa durante a realização do experimento. Foram ainda anestesiados por inalação com isoflurano, na concentração alveolar mínima de 1,2 a 1,7%.

Inicialmente realizou-se a tricotomia dos pelos nas partes a serem utilizadas, seguido das demarcações das áreas para aplicação das amostras na região dorsal, lateral esquerda e lateral direita. As demarcações em cada região foram feitas em três linhas, correspondendo aos dias de coletas de biópsias – 1, 7 e 21 dias após aplicação. Utilizando caneta permanente, foram feitos *spots* de 2 cm² com espaçamento de 2 cm entre eles (**Figura 12**).

Figura 12. Esquema das demarcações dos *spots* para aplicação das formulações do experimento *in vivo*.



Fonte: A autora.

As amostras foram aplicadas com *swab*, de forma randomizada. No momento de cada aplicação as amostras foram homogeneizadas. Após a aplicação das amostras, os animais foram mantidos reclusos, com alimentação e água em horários previamente definidos, em local adequado visando evitar lesões e contaminações. Após 1, 7 e 21 dias após a aplicação das formulações foram realizadas as coletas das biópsias com *punch* estéril de 4 mm.

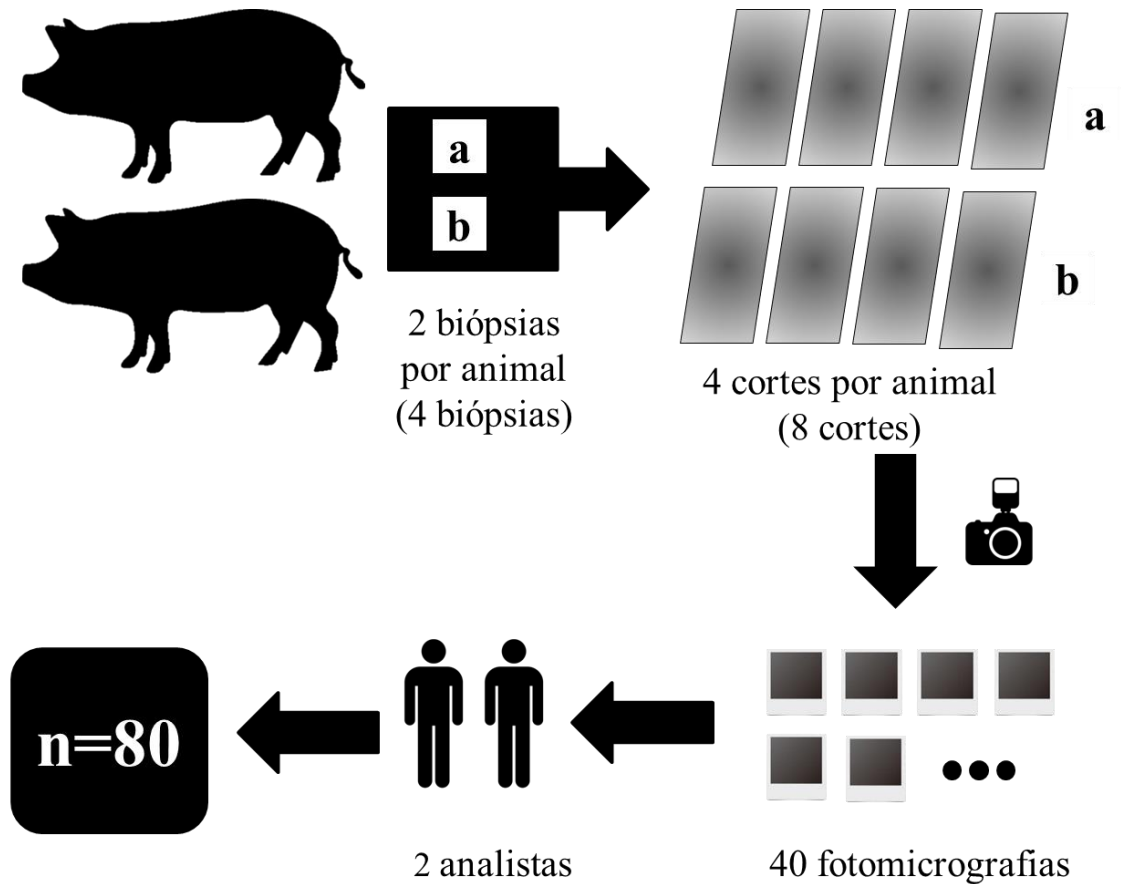
4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após a realização das biópsias com *punch*, os tecidos foram imediatamente armazenados em frascos contendo formol 10% e, 72 h após, lavados com água destilada e conservados em etanol 70% até o momento do processamento histológico no histotécnico (Leica[®] TP 1620). As amostras passaram por um processo de desidratação, com crescentes graduações de soluções etanólicas e, em seguida, foram diafanizadas com xilol; incluídas em parafina histológica fundida a 60°C. Os blocos foram resfriados e cortes de 5 µm de espessura foram feitos com o auxílio de um micrótomo (Leica[®] RM 2125RT) que, na sequência, foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Herovici (HR).

4.2.1 Coloração, Obtenção e Análise das Fotomicrografias

Inicialmente, foram selecionadas aleatoriamente amostras sendo: 2 biópsias da mesma formulação do mesmo animal (lados diferentes, sendo um dorso e uma lateral), para os 2 animais (um macho e uma fêmea), totalizando 8 amostras de cada formulação, para cada dia. De cada biópsia foram selecionados 2 cortes para cada coloração e de cada corte foram obtidas 5 fotomicrografias de regiões distintas. As contagens foram realizadas por dois analistas cegos e calibrados, resultando em um *n* amostral de 80 (**Figura 13**). Os analistas foram treinados previamente de acordo com os parâmetros predeterminados para este estudo.

Figura 13. Fluxograma do ensaio in vivo até as análises histomorfométricas.



Fonte: A autora.

Para avaliar a proporção dos componentes das diferentes amostras, foi feita a coloração HE das biópsias coletadas nos dias 1, 7 e 21 (BEHEMER; TOLOSA; FREITAS-NETO, 1976). Os componentes considerados para contagem foram: células, substância fundamental e colágeno. Para realizar a diferenciação de colágeno tipo I (antigo) e tipo III (novo), foram avaliadas as biópsias do dia 21, pela coloração HR (**Tabela 4**).

Tabela 4. Procedimento para coloração Herovici.

Reagente	Tempo (min)
Xilol	5
Xilol	5
Álcool absoluto	1
Álcool absoluto	1
Álcool absoluto	1
Lavagem com água	1
Hematoxilina de Weigert	5
Solução Herovici	2
Ácido acético (1%)	2
Álcool absoluto	1
Álcool absoluto	1
Álcool absoluto	1
Xilol	1
Xilol	1
Xilol	1

Fonte: A autora.

As imagens da derme foram capturadas no aumento de 400x (câmera fotográfica Olympus® evolt E-420 OUTFIT zuiko digital 14 - 42 mm f 3,5 – 5,6) e analisadas por meio do software ImageJ® 1.51j8. Para a contagem dos componentes, foi colocada sobre cada imagem uma malha quadriculada, com 80 pontos, os quais marcaram os elementos a serem contados (células, substância fundamental e colágeno por HE – colágeno tipo I, colágeno tipo II por HR). Ao final das análises das fotomicrografias pelos dois analistas, foram obtidos 614.400 pontos; uma vez que foram 80 imagens (**Figura 13**) com 80 pontos em cada uma, para 8 formulações apresentadas neste trabalho.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® 5.01 e os resultados experimentais expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP). Empregou-se ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste de Bonferroni, sendo os fatores o tempo da coleta da biópsia e o tipo de tratamento para os dados obtidos em HE e ANOVA de uma via para os dados obtidos em HR. O nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Para as amostras contendo NOV os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão (EP). Empregou-se ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey, para dados obtidos em HE; o nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

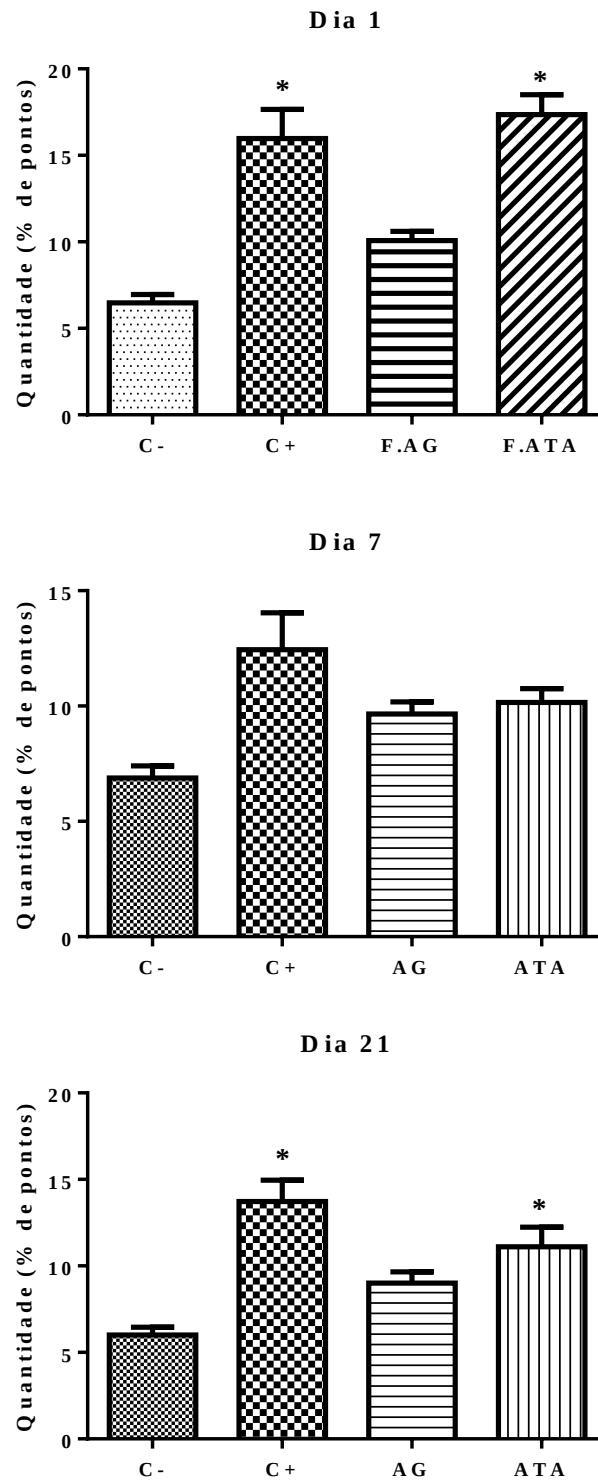
5.1 ABORDAGEM 1 – AG E ATA COMO SUBSTITUINTES DO FENOL

Os modelos suínos são amplamente utilizados nas mais diferentes áreas de pesquisa por fornecerem uma estimativa adequada dos efeitos dos procedimentos ou tratamentos em seres humanos. Assim como os sistemas gastrointestinal e cardiovascular, por exemplo, a pele dos porcos tem aparência histológica e função fisiológica próxima à do homem (SWINDLE *et al.*, 1988).

Após o preparo das formulações, foi possível perceber a instabilidade das mesmas (separação de fases), sendo necessária a homogeneização a cada aplicação de todas as formulações.

Inicialmente, foram realizadas as contagens dos componentes da derme pela coloração HE, nos grupos selecionados. Constatou-se o aumento significativo da quantidade de células na derme no primeiro dia após a aplicação das formulações de *peeling*, em comparação com os dados do sétimo e vigésimo primeiro dias de avaliação, para as amostras do controle positivo (C⁺) e da formulação contendo ATA (F.ATA) (**Figura 14**). Este aumento é indicativo do processo inflamatório desencadeado após a aplicação destas formulações e pode ser observado na **Figura 15**.

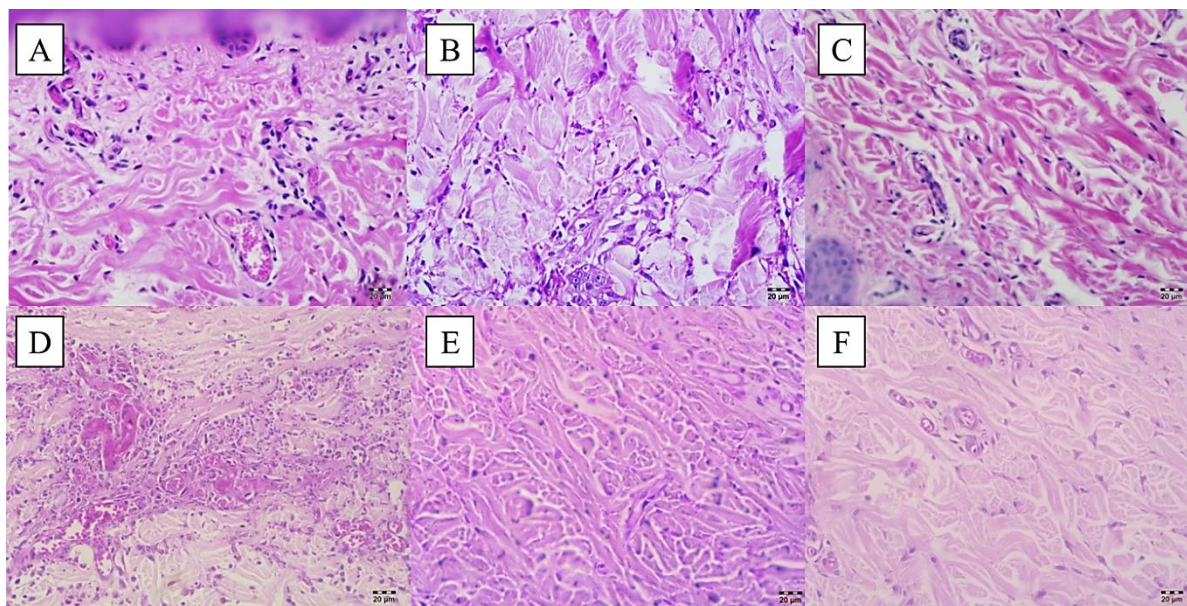
Figura 14. Quantidade de células na derme de suínos, após 1, 7 e 21 dias da aplicação das formulações (C⁻, C⁺, F.AG e F.ATA).



Fonte: A autora.

Nota: *diferença estatística em relação ao C⁻ $p \leq 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni); as barras representam a média das contagens (n=80).

Figura 15. Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do C⁺ e F.ATA (1, 7 e 21 dias).



Fonte: A autora.

Nota: **A** – C⁺ dia 1; **B** – C⁺ dia 7; **C** – C⁺ dia 21; **D** – F.ATA dia 1; **E** – F.ATA dia 7; **F** – F.ATA dia 21; aumento de 400x, coloração HE.

Ainda, vale ressaltar que estas mesmas amostras (C⁺ e F.ATA) demonstraram diferença estatística na quantidade de células em relação ao C⁻ (**Figura 14**). De modo contrário, as amostras da aplicação de F.AG não apresentaram diferença na quantidade de células na derme ao longo dos dias, sugerindo não ter ocorrido reação inflamatória, ou em caso de produção de uma reação inflamatória, esta não foi intensa e não pode ser mensurada estatisticamente.

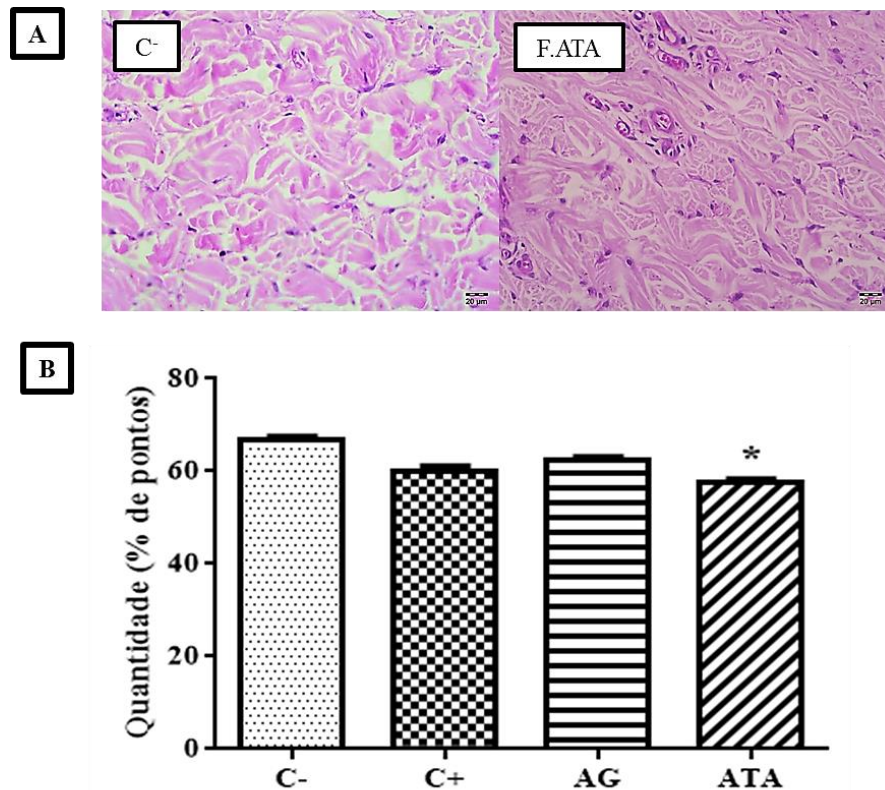
Durante o desencadeamento de um processo inflamatório, inicialmente observa-se vasodilatação, que ocasiona um aumento no fluxo sanguíneo da região inflamada, seguida de leucodiapedese (migração de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido), migração de polimorfonucleares e em seguida de monócitos (SAMPAIO; RIVITTI, 2001). Os resultados das análises das amostras de pele referentes aos grupos C⁺ e F.ATA sugerem a ocorrência destes eventos que configuram o processo inflamatório, revelando um aumento na proporção de células, superior em relação aos demais componentes avaliados (substância fundamental e colágeno) e em comparação ao C⁻. Estes achados são reforçados pelos resultados obtidos por Gonser e colaboradores (2017) que avaliaram tecido cutâneo humano (retirado por lipoescultura facial) após 24 horas de aplicação de *peeling* com formulações contendo fenol + OC, ATA 25% e 40% e observaram necrose epidérmica intensa, edema e infiltrado inflamatório acentuado após aplicação das formulações.

Reforçando a possibilidade de um processo inflamatório, destaca-se o fato de já ser bem estabelecido pela literatura que os componentes químicos presentes no OC (principalmente os forbóis) serem promotores de inflamação em diferentes modelos de ensaios biológicos que buscam novos agentes anti-inflamatórios (CAMPONOGARA *et al.*, 2018; CARDIA *et al.*, 2018; SARI *et al.*, 2016; NISHIKI *et al.*, 1988).

Vale ainda ressaltar que Larson, Karmo e Hetter (2009), buscando explorar o potencial pró-inflamatório do OC, avaliaram diferentes formulações contendo variadas concentrações de fenol e OC (incluindo fenol isoladamente) e constataram que o acréscimo da quantidade de OC, além de aumentar os sinais inflamatórios, promovia melhores resultados do que a formulação apenas contendo fenol. Estes dados corroboram os resultados obtidos neste trabalho para as formulações F.AG e F.ATA, especialmente a formulação contendo ATA, uma vez que a profundidade e os efeitos dos *peelings* que empregam os agentes químicos citados sem OC não costumam ser tão intensos (WEISSLER *et al.*, 2017; BEGUM *et al.*, 2016; GOH; LIM, 2016; TRUCHUELO; CERDÁ; FERNÁNDEZ, 2016; YOKOMIZO *et al.*, 2013).

A continuidade de interpretação dos dados obtidos com a aplicação de F.ATA, após 21 dias, revelaram maior celularidade em relação ao C⁻, (**Figura14**) denotando um aumento da quantidade de fibroblastos (**Figura16A**), como visto por Justo (2018), e não mais de células inflamatórias o que pode ser suposto com base nos resultados dos dados de colágeno da mesma amostra (**Figura 16B**).

Figura 16. **A** - Fotomicrografias da derme de suínos após 21 dias da aplicação do C- e F.ATA; . **B** - Quantidade de colágeno total na derme de suínos após 21 dia de aplicação das formulações (C-, C+, F.AG e F.ATA) representada em porcentagem.



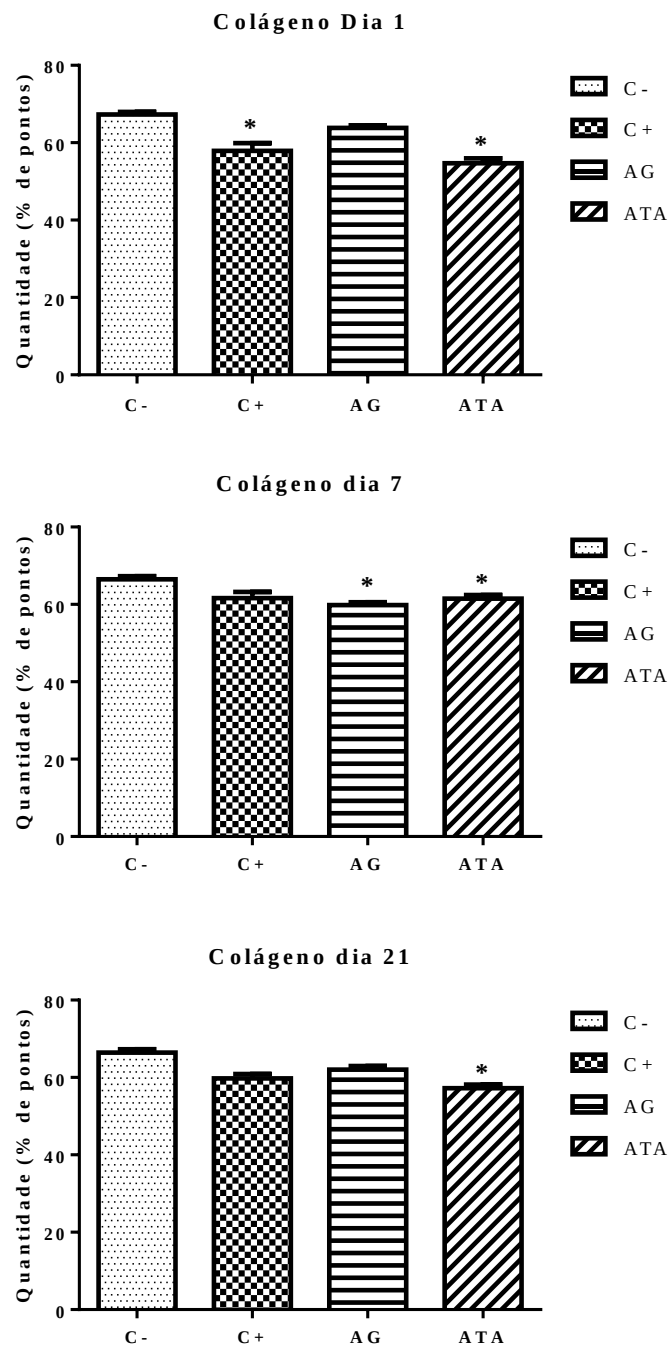
Fonte: A autora.

Nota: aumento de 400x, coloração HE; *diferença estatística em relação ao C- $p \leq 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni); as barras representam a média das contagens (n=80).

Avaliando a quantidade de colágeno, ainda na coloração HE, foi constatado que as amostras C⁺, F.AG e F.ATA tiveram um acréscimo significativo na quantidade dessa substância tecidual até o sétimo dia do experimento. Isto não foi observado nos dados do dia 21, o que provavelmente deve-se ao tipo de análise empregada. Por ser realizada uma contagem proporcional por campo, ao aumentar a quantidade de células, como mencionado anteriormente, os demais componentes reduzem, deste modo, não se considera este último fato um achado negativo, uma vez que o aumento de fibroblastos, em longo prazo, produzirá um efeito positivo na produção de colágeno.

Ao avaliar a quantidade de colágeno presente na derme em comparação ao C⁻, para o dia 7 as amostras provenientes da aplicação de F.AG e F.ATA apresentaram diferença, assim como no dia 21 os dados das análises do C⁺ e F.ATA apresentaram-se diferentes em relação ao C⁻ (**Figura 17**). O grupo tratado com F.AG não apresentou diferença estatística frente ao C⁻.

Figura 17. Quantidade de células na derme de suínos, após 1, 7 e 21 dias da aplicação das formulações (C-, C+, F.AG e F.ATA).

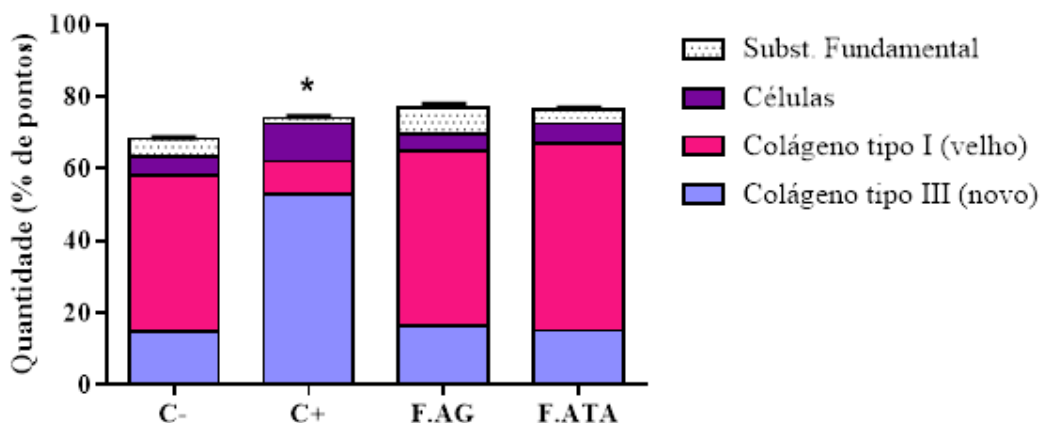


Fonte: A autora.

Nota: *diferença estatística em relação ao C- $p \leq 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni); as barras representam a média das contagens (n=80).

Analisando os tecidos biopsiados 21 dias após a aplicação das formulações pela coloração de Herovici, buscando diferenciar o colágeno tipo I (maduro) do colágeno tipo III (jovem), não foi observada diferença estatística na quantidade de colágeno tipo III para os grupos tratados com F.AG e F.ATA em comparação ao C⁻ (**Figura 18**).

Figura 18. Distribuição dos componentes histológicos na derme de suínos, após 21 dias da aplicação das formulações (C⁻, C⁺, F.AG e F.ATA).



Fonte: A autora.

Nota: *diferença estatística em relação ao C⁻ $p \leq 0,05$ (ANOVA de uma via seguido de Bonferroni). As barras representam a média das contagens (n=80).

Apesar da quantidade total de colágeno aumentar significativamente aos 21 dias após o tratamento com F.ATA (observado na **Figura 18**, coloração HE) e a elevação da contagem celular no mesmo período indicar aumento de fibroblastos, a proporção entre os colágenos tipo I e tipo III não revelou um efeito tão benéfico para esta formulação quanto para o C⁺.

5.2 ABORDAGEM 2 – AVALIAÇÕES PRELIMINARES DOS CL

Para as formulações obtidas a partir dos sistemas ternários contendo ácido oleico/ Brij[®] 58/ água e ácido oleico+OC/ Brij[®] 58/ água, inicialmente foi realizada uma avaliação visual, sendo a homogeneidade comparada no momento da preparação e após uma semana de armazenamento. Para o sistema considerado inerte (sem OC), inicialmente foram obtidos 21 sistemas homogêneos e após uma semana em repouso 18 das 36 amostras preparadas permaneceram estáveis. Enquanto nos sistemas considerados “ativos” (contendo OC) foram observadas 22 preparações homogêneas no momento do preparo, que assim se mantiveram durante a semana de avaliação. Os demais parâmetros estudados para os sistemas homogêneos podem ser visualizados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Avaliação e classificação visual das formulações homogêneas obtidas a partir dos sistemas ternários de ácido oleico/ Brij®58/ água e ácido oleico+OC/ Brij®58/ água.

(continua)

Formulações inertes (sem OC)			Formulações ativas (com OC)		
Composição % (água:tensoativo:óleo)	Aspecto	Viscosidade	Composição % (água:tensoativo:óleo)	Aspecto	Viscosidade
10:20:70	Límpido	Pouco viscoso	10:20:70	Límpido	Pouco viscoso
10:30:60	Límpido	Pouco viscoso	10:30:60	Límpido	Pouco viscoso
40:10:50	Leitoso	Muito viscoso	40:10:50	Leitoso	Viscoso
20:30:50	Límpido	Pouco viscoso	20:30:50	Límpido	Pouco viscoso
10:40:50	Límpido	Pouco viscoso	10:40:50	Límpido	Pouco viscoso
50:10:40	Leitoso	Viscoso	50:10:40	Leitoso	Viscoso
20:40:40	Límpido	Muito viscoso	20:40:40	Límpido	Muito viscoso
10:50:40	Límpido	Pouco viscoso	10:50:40	Límpido	Pouco viscoso
30:40:30	Levemente opaco	Muito viscoso	30:40:30	Levemente opaco	Muito viscoso
50:30:20	Levemente opaco	Muito viscoso	50:30:20	Levemente opaco	Muito viscoso
40:40:20	Levemente opaco	Muito viscoso	40:40:20	Levemente opaco	Muito viscoso
30:50:20	Levemente opaco	Muito viscoso	30:50:20	Levemente opaco	Muito viscoso
20:60:20	Levemente opaco	Muito viscoso	20:60:20	Levemente opaco	Muito viscoso
10:70:20	Leitoso	Muito viscoso	10:70:20	Leitoso	Muito viscoso
60:30:10	Opaco	Muito viscoso	60:30:10	Opaco	Muito viscoso
50:40:10	Levemente opaco	Muito viscoso	50:40:10	Levemente opaco	Muito viscoso
40:50:10	Levemente opaco	Muito viscoso	40:50:10	Levemente opaco	Muito viscoso
30:60:10	Levemente opaco	Muito viscoso	30:60:10	Levemente opaco	Muito viscoso

Tabela 5. Avaliação e classificação visual das formulações homogêneas obtidas a partir dos sistemas ternários de ácido oleico/ Brij®58/ água e ácido oleico+OC/ Brij®58/ água.

(conclusão)

Formulações inertes (sem OC)			Formulações ativas (com OC)		
Composição % (água:tensoativo:óleo)	Aspecto	Viscosidade	Composição % (água:tensoativo:óleo)	Aspecto	Viscosidade
-	-	-	20:70:10	Levemente opaco	Muito viscoso
-	-	-	10:80:10	Leitoso	Muito viscoso
-	-	-	20:50:30	Levemente opaco	Muito viscoso
-	-	-	10:60:30	Límpido	Pouco viscoso

Fonte: A autora.

Quanto ao aspecto (límpido, opaco ou leitoso) para os sistemas inertes foram obtidas 6 misturas límpidas, 11 opacas e 8 leitosas. Já para os sistemas ativos foram classificadas 7 amostras como misturas límpidas, 10 como opacas e 4 como leitosas. Quanto à viscosidade, tanto para as misturas inertes quanto para as ativas, a maioria dos sistemas homogêneos apresentou uma viscosidade mais elevada.

De modo geral, ambos os sistemas (inerte e ativo) tiveram misturas predominantemente límpidas ou levemente opacas e com alta viscosidade. A limpidez é uma das características dos CL, sendo assim as amostras que se apresentaram leitosas não foram usadas no estudo para as etapas subsequentes.

Cristais líquidos de fase cúbica apresentam propriedades bioadesivas, formando uma membrana sobre a pele (aplicação tópica) além de normalmente terem maior viscosidade. Essas estruturas cúbicas interagem com o estrato córneo de modo a possibilitar a permeação e liberação controlada dos ativos (RAPALLI *et al.*, 2020; FORMARIZ *et al.*, 2005; HYDE, 2001). Trabalhos que avaliam cristais líquidos desenvolvidos com PPG-5-CETETH-20 e ácido oleico demonstram que este sistema é promissor quando o objetivo é a aplicação tópica, ainda em alguns trabalhos sua fase lamelar aumentou a retenção do ativo na pele enquanto que a fase cúbica promoveu a penetração transdérmica apesar da fase lamelar normalmente ser indicada para uma maior penetração (RAPALLI *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2017; OYAFUSO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2014). Sendo assim, ao avaliar as misturas ativas

utilizando a MLP buscaram-se formas cúbicas (isotrópicas) com visualização apenas do campo escuro, e formas lamelares pela visualização de Cruzes de Malta (anisotrópicas).

Para realizar o experimento *in vivo* foram escolhidas 3 formulações inertes e 5 ativas (Tabela 6). Sendo todas elas homogêneas, translúcidas, de fase cúbica ou lamelar e, das ativas, com maior concentração de OC.

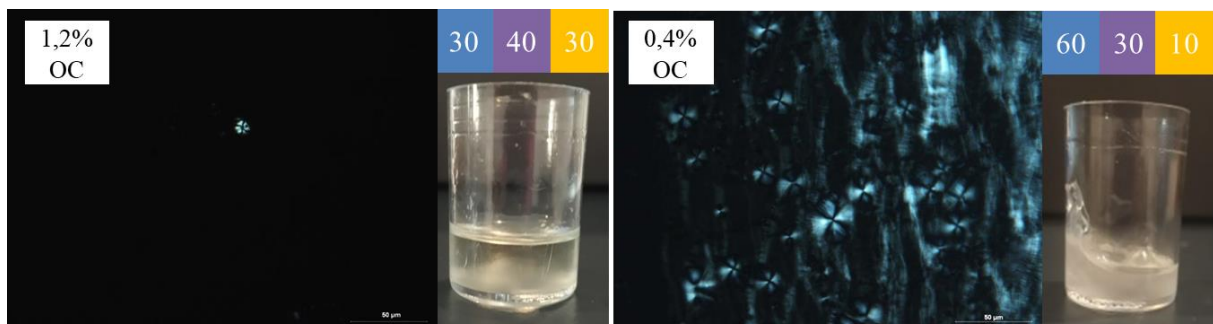
Tabela 6. Formulações escolhidas para realizar o ensaio *in vivo*.

Formulações inertes (sem OC)		Formulações ativas (com OC)		
Composição % (água:tensoativo:óleo)	Fase	Composição % (água:tensoativo:óleo)	Fase	Concentração de OC
10:20:70	Cúbica	10:20:70	Cúbica	2,8%
-	-	10:50:40	Cúbica	2%
30:40:30	Cúbica	30:40:30	Cúbica	1,2%
50:30:20	Lamelar	50:30:20	Lamelar	0,8%
-	-	60:30:10	Lamelar	0,4%

Fonte: A autora.

Das formulações ativas escolhidas, apenas as com 30% de Brij®58 apresentaram estruturas de Cruz de Malta, quando observadas no microscópio de luz polarizada, o que significa que se encontram na fase lamelar; as demais formulações encontram-se na fase cúbica (Figura 19).

Figura 19. Fotomicrografias obtidas por MLP evidenciando a fase cúbica da amostra contendo 30% água/40% Brij®58/30% ácido oleico+OC e a fase lamelar (Cruz de Malta e anisotropia estriada) da amostra contendo 60% água/30% Brij®58/10% ácido oleico+OC (aumento de 500x).



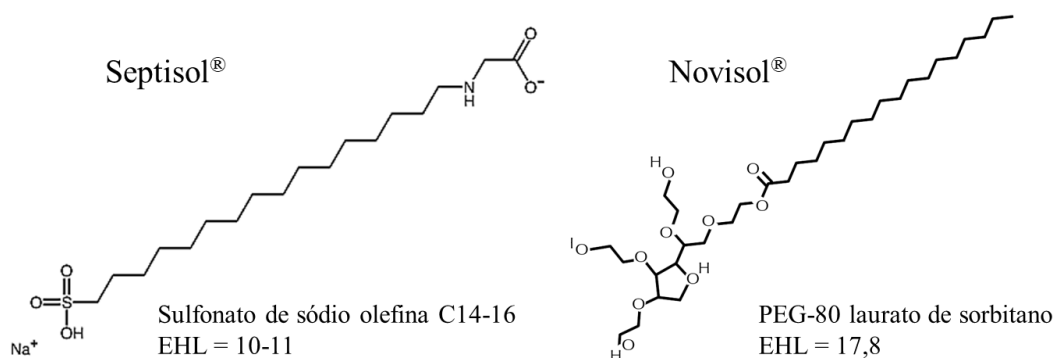
Fonte: A autora.

As amostras testadas no modelo suíno, ao serem avaliadas de maneira preliminar, não foram capazes de desencadear um processo inflamatório e, por consequência, não ocorreram alterações nos níveis de colágeno ao longo de 21 dias de acompanhamento. Acredita-se que isso se deve ao curto período de contato das formulações com a pele. Para conclusões mais precisas e um aproveitamento melhor das fórmulas faz-se necessário realizar a caracterização físico-química dessas formulações, bem como seu perfil de liberação e permeação cutânea.

5.3 ABORDAGEM 3 – FORMULAÇÕES CONTENDO NOVISOL[®] E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OC

O SEP foi utilizado em *peelings* de fenol com OC por décadas, porém sua descontinuação após a proibição do triclosan pelo FDA desencadeou a busca imediata por substituintes que não apenas mantivessem a efetividade da fórmula, mas que também demonstrassem resultados melhores principalmente com relação à estabilidade da fórmula. Assim, um novo componente chamado de Novisol[®] (NOV) começou a ser testado e, apesar do nome comercial sugestivamente semelhante, a composição é bem distinta. Enquanto que o SEP tinha como tensoativo o sulfonato de sódio olefina C14-16 (SSOC14-16), o NOV traz o PEG-80 laurato de sorbitano (PEG-80LS). Estes dois agentes possuem estruturas químicas bem distintas, logo seu EHL (equilíbrio hidrófilo lipofílico) também difere (**Figura 20**) (GELARDI *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Figura 20. Estrutura química dos tensoativos aniônicos presentes no Septisol[®] e no Novisol[®] e seus respectivos valores de EHL.



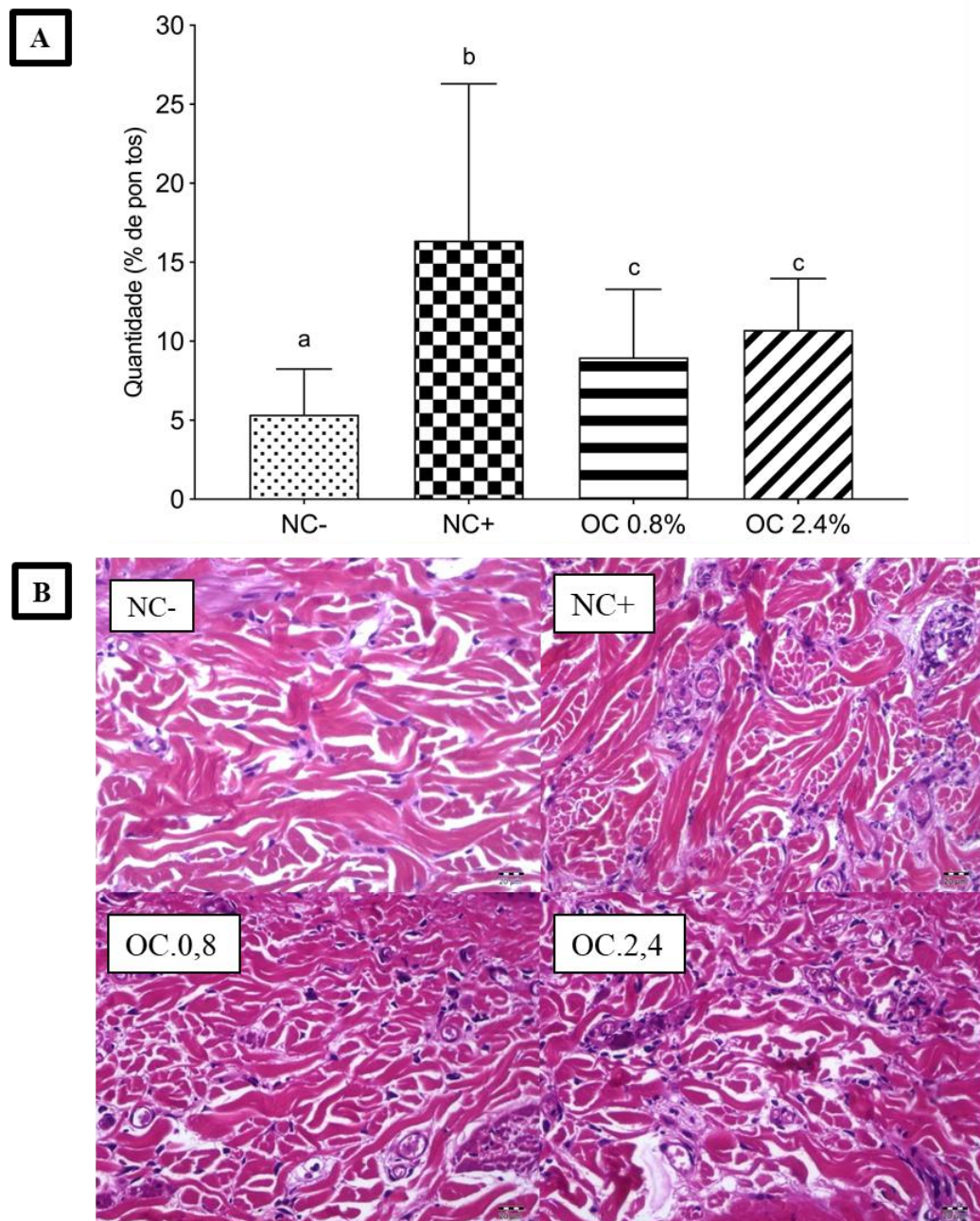
Fonte: A autora.

Esta diferença explica o aumento da estabilidade na troca de SEP por NOV observada por Justo e colaboradores 2020, em que a fórmula contendo SEP iniciava a separação 1 minuto após seu preparo e em 14 horas observa-se a separação total em duas fases, enquanto que a formulação contendo NOV permaneceu estável por todo o período de avaliação. O SSOC14-16 possui EHL = 10-11 e comporta-se como agente emulsionante, enquanto o PEG-80LS possui EHL = 17,8 e comporta-se como agente solubilizante (GELARDI *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2012; GRIFFIN, 1949 *apud* GELARDI *et al.*, 2016).

A partir dos resultados favoráveis obtidos por Justo e colaboradores (2020) na profundidade da reação inflamatória utilizando NOV na fórmula “*very heavy*” de Hetter, avaliamos o efeito da variação de concentração de OC na formulação mantendo a mesma quantidade de fenol.

As formulações OC.0,8 e OC.2,4 foram escolhidas para um estudo inicial e, ao avaliar as contagens dos componentes da derme pela coloração HE, constatou-se que no primeiro dia após a aplicação do *peeling* tanto o NC⁺ quanto as duas amostras tiveram maior contagem celular do que o NC⁻, indicando o desencadeamento do processo inflamatório, porém o NC⁺ foi capaz de causar este efeito de maneira mais intensa (**Figura 21**).

Figura 21. **A** - Quantidade de células na derme de suínos após 1 dia de aplicação das formulações (NC⁻, NC⁺, OC.0,8 e OC.2,4) representada em porcentagem. **B** - Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do NC⁻, NC⁺, OC.0,8 e OC.2,4.



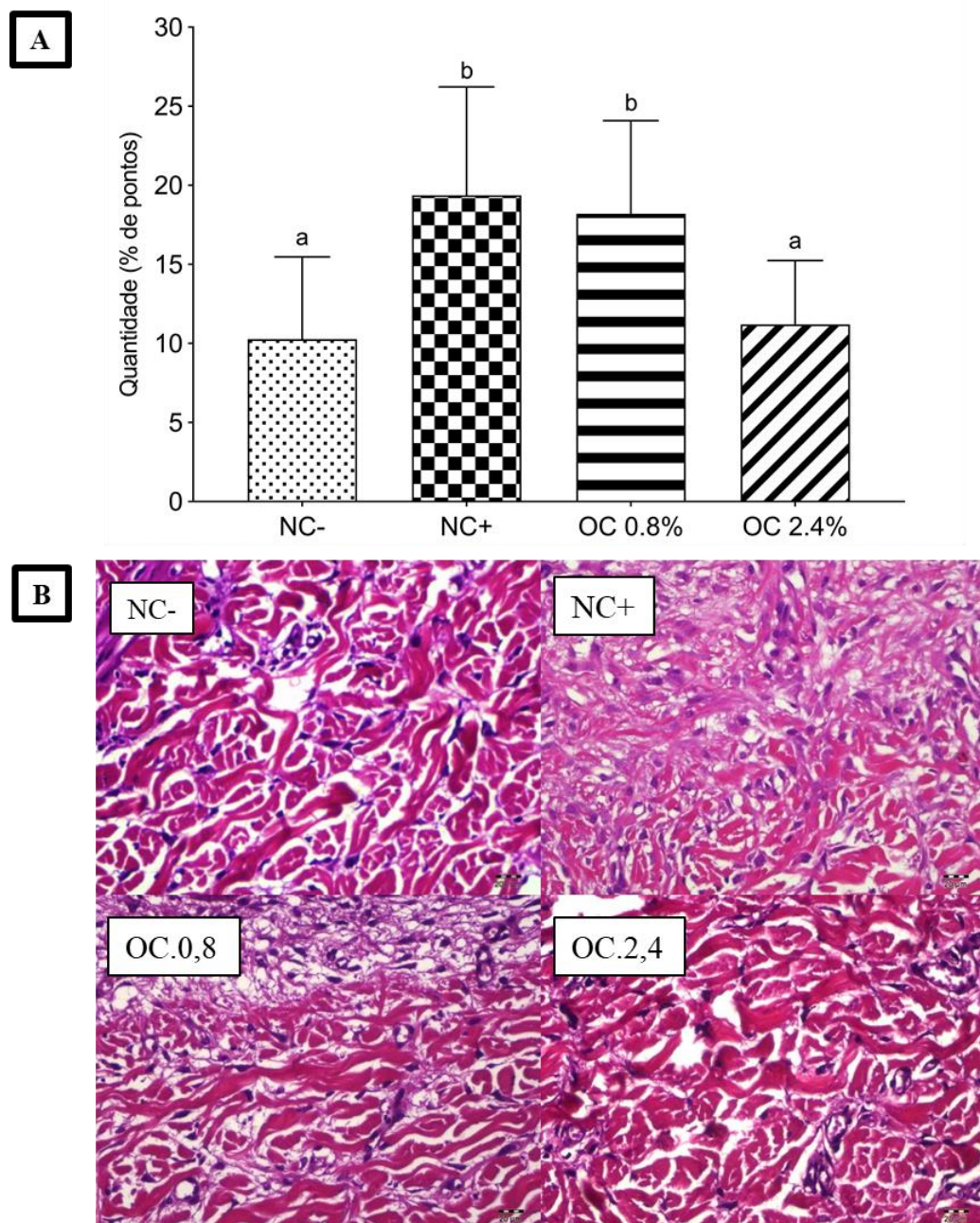
Fonte: A autora.

Nota: As colunas e as barras representam a média $\pm$ EP (n=80). Aumento de 400x, coloração HE. Letras diferentes revelam diferença estatística em relação ao C- $p \leq 0,05$ (ANOVA de uma via seguido de Tukey).

Para os tecidos analisados 21 dias após a aplicação dos *peelings*, a formulação OC.2,4 não apresentou diferença quando comparada ao NC⁻, mas os resultados de OC.0,8 foram muito semelhantes ao NC⁺ (**Figura 22**). Assim como discutido anteriormente, a contagem celular um dia após a aplicação sugere reação inflamatória, porém após 21 dias esta

contagem está relacionada ao aumento de fibroblastos (JUSTO, 2018; CAMPONOGARA *et al.*, 2018; SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

Figura 22. **A** - Quantidade de células na derme de suínos após 21 dias de aplicação das formulações (NC⁻, NC⁺, OC.0,8 e OC.2,4) representada em porcentagem. **B** - Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do NC⁻, NC⁺, OC.0,8 e OC.2,4.



Fonte: A autora.

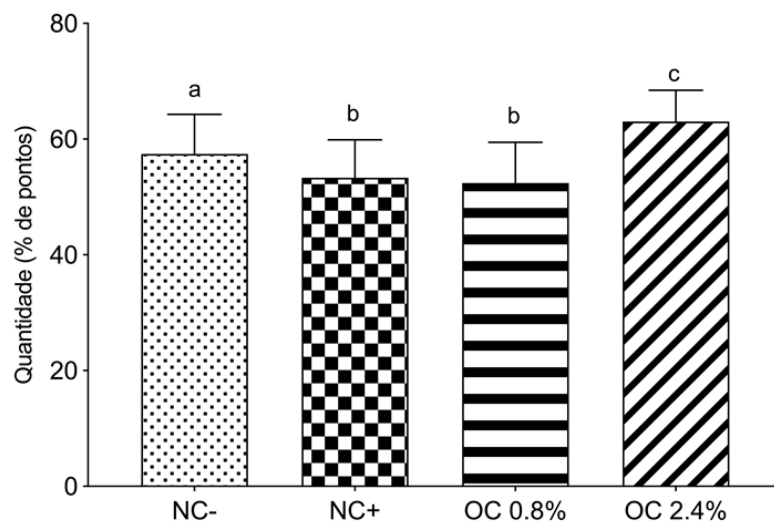
Nota: As colunas e as barras representam a média $\pm$ EP (n=80). Aumento de 400x, coloração HE. Letras diferentes revelam diferença estatística em relação ao C- $p \leq 0,05$ (ANOVA de uma via seguido de Tukey).

Quanto à quantificação de colágeno na coloração HE, observou-se uma queda na quantidade de colágeno após a aplicação dos *peelings* comparando-se em um mesmo grupo as

amostras obtidas após 1 dia e após 21 dias da aplicação. Como citado anteriormente, isto pode ser pelo curto período de acompanhamento, já que a fase de remodelação tecidual da pele que é a fase final da cicatrização pode durar de 21 dias a 2 anos após o dano (PARK; HWANG; YOON, 2017; COOPER, 1990).

Ao comparar a quantidade de colágeno após 21 dias dos diferentes tratamentos a formulação com maior concentração de OC demonstrou mais colágeno em comparação às demais (**Figura 23**), o que sugere que, apesar da reação inflamatória ter sido menos intensa para OC.2,4 do que NC⁺, ocorreu maior produção de colágeno em OC.2,4. Para esclarecer melhor esse resultado ainda deve ser investigado o tipo de colágeno predominante nas amostras (tipo I ou tipo III).

Figura 23. Quantidade de colágeno na derme de suínos após 21 dias de aplicação das formulações (NC⁻, NC⁺, OC.0,8 e OC.2,4) representada em porcentagem.

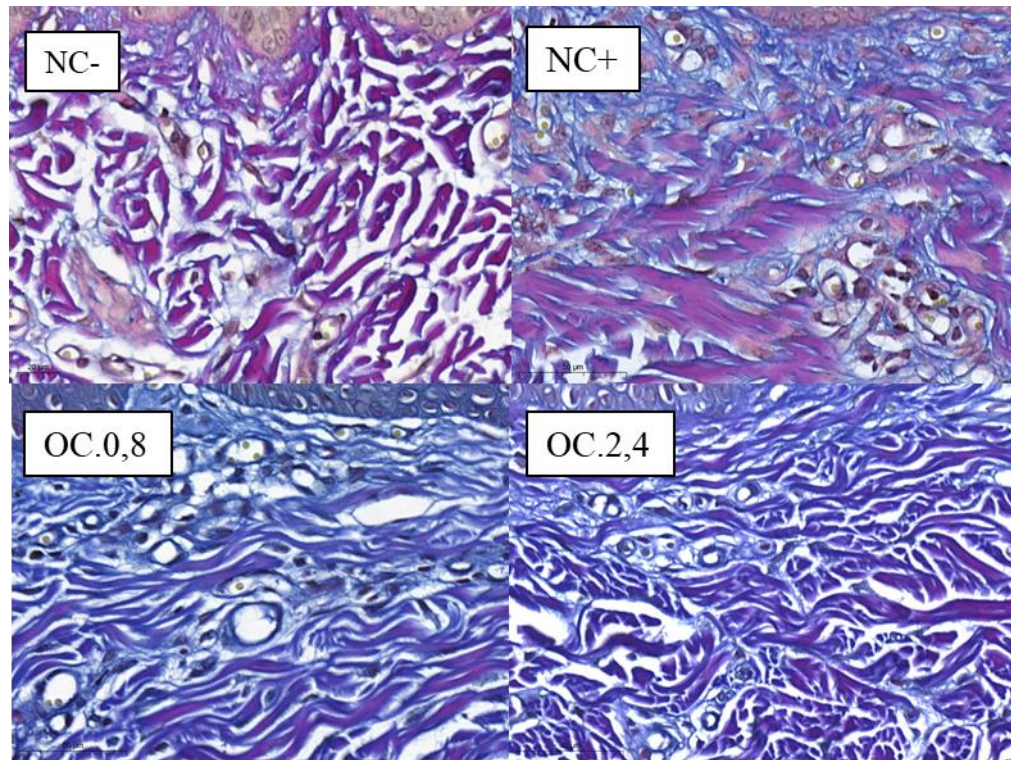


Fonte: A autora.

Nota: As colunas e as barras representam a média $\pm$ EP (n=80). Letras diferentes revelam diferença estatística em relação ao NC- $p \leq 0,05$ (ANOVA de uma via seguido de Tukey).

Ainda se faz necessária a uma avaliação mais detalhada dos efeitos dos tratamentos NC⁺, OC.0,8 e OC.2,4 para esclarecer qual o real efeito da variação da concentração de OC na produção de colágeno. Uma análise superficial das fotomicrografias obtidas a partir da coloração de Herovici (HR), na qual o colágeno novo (tipo III) é identificado pela cor azul e o colágeno maduro (tipo I), nos permite constatar que ambas as formulações contendo OC desencadeiam intensa formação de colágeno tipo III, mesmo em concentrações mais baixas (**Figura 24**). Uma análise quantitativa deverá trazer mais esclarecimentos.

Figura 24. Fotomicrografias da derme de suínos após diferentes dias aplicação do NC⁻, NC⁺, OC.0,8 e OC.2,4; aumento de 400x, coloração HR.



Fonte: A autora.

O uso do NOV, além de fornecer uma formulação mais estável e, portanto mais segura quanto aos resultados, claramente não compromete os resultados de *peeling* profundo estabelecido há cerca de seis décadas. O ajuste das concentrações dos componentes da formulação, a técnica de aplicação, bem como o uso de um tratamento prévio ainda deve ser mais bem estudado. Além disso, a concentração do tensoativo presente no NOV, bem como a sua quantidade adequada a ser utilizada em formulações de *peeling* de fenol com OC precisa ser esclarecida.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Ao analisar os tecidos resultantes dos diferentes tratamentos testados, C⁻, C⁺, F.AG e F.ATA, foi possível constatar o desencadeamento do processo inflamatório característico dos *peelings* químicos. Apesar disso, ao avaliar os cortes na coloração HR não foi encontrada a maior proporção de colágeno tipo III como era o esperado. Os resultados observados no estudo, até este momento, indicam que as formulações propostas têm bom potencial e menor toxicidade, mas seus efeitos em longo prazo ainda precisam ser melhores investigados.

Embora as formulações F.AG e F.ATA tenham demonstrado resultados interessantes, a estabilidade das mesmas ainda está longe de ser ideal, visto que ocorre separação dos componentes em cerca de 15 minutos após o preparo.

Com o preparo de sistemas ternários obtidos a partir de ácido oleico/ PPG-5-CETETH-20 (Brij[®] 58)/ água, com e sem OC, foi possível incorporar o OC e nos sistemas e obter diferentes fases de cristais líquidos. A partir da microscopia de luz polarizada, 5 formulações foram escolhidas, com fase cúbica e lamelar, para realizar o ensaio *in vivo*, com concentrações de OC variando de 0,4% até 2,8%. Apesar da reconhecida capacidade dos CL proporcionarem a permeação de fármacos, no modelo testado não foi possível observar as reações fisiológicas esperadas de inflamação 24 horas após a aplicação. Para um melhor entendimento e aproveitamento desses sistemas é necessário realizar ensaios de caracterização físico-química e, principalmente, de liberação e permeação cutânea.

Por fim, com a terceira abordagem deste trabalho, avaliando as formulações OC.0,8 e OC.2,4 em comparação ao NC⁻ foi possível constatar que, mesmo na concentração mais baixa de OC, ocorre um aumento da quantidade de células em 24 horas, indicando o processo inflamatório, apesar do NC⁺, tendo a concentração intermediária, ainda ter a maior reação inflamatória. Após 21 dias dos tratamentos, a contagem celular revelou que o NC⁺ e OC.0,8 atingiram o mesmo aumento com relação ao NC⁻, ou seja, concentrações de 0,8% e 2,4% de OC no *peeling* podem ter promovido a migração de fibroblastos com mesma intensidade. Do mesmo modo, ambos apresentam mesma quantidade de colágeno total em 21 dias. Por outro lado, a fórmula OC.2,4, que teve menor reação inflamatória em 24 horas, também apresentou menos células em 21 dias, mas maior quantidade de colágeno total, demonstrando um efeito melhor do que NC⁺ (1,6% de OC). Para esclarecer melhor estes resultados e compreender o real efeito da variação de OC nesse tipo de formulação ainda é preciso avaliar a contagem diferencial de colágeno (tipo I e tipo III), bem como outras variações na concentração.

Ao desenvolver três distintas abordagens, foi possível lançar luz sobre possibilidades envolvendo *peeling* profundo e o OC. As formulações contendo AG e ATA não tiveram a mesma eficácia que o fenol, porém seu uso pode ser avaliado em associação com pré-tratamentos; foi possível obter CL e esta é uma opção tecnológica promissora e precisam ser melhor investigados; por fim, o uso do NOV com diferentes concentrações de OC pode trazer resultados ainda melhores do que as formulações que estão sendo utilizadas atualmente, com menor reação inflamatória e maior produção de colágeno.

REFERÊNCIAS

- 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 for facial rejuvenation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 29, n. 2, p. 199-207, 1962.
- BEGUM, S. T. *et al.* A comparative study on efficacy of 30% trichloroacetic acid versus 35% glycolic acid peel in the treatment of melasma. **Journal of Armed Forces Medical College**, v. 12, n. 1, p. 68-71, 2016.
- BEHEMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. 1976. **Manual para histologia normal e patológica**. 3 ed. São Paulo: Edart-Edusp. 1976.
- BERNARDO, A. F. C.; SANTOS, K.; SILVA, D. P. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em Foco**, n. 11, p. 1221-1233, 2019.
- BONIFÁCIO, B. V. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.
- BRODY, H. J. Complications of chemical peels. In: BRODY, H. J. **Chemical peeling and resurfacing**. St. Louis: Mosby, 1997. p. 161-93.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 91, p. 1-7, 2019.
- CAMPONOGARA, C. *et al.* *Nasturtium officinale* R. Br. effectively reduces the skin inflammation induced by croton oil via glucocorticoid receptor-dependent and NF- κ B pathways without causing toxicological effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.229, p. 190-204, 2018.
- CARDIA, G. F. E. *et al.* Effect of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on acute inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1-10, 2018.
- CHISAKI, C.; HORN, G.; NORIEGA, L. F. Phenol solutions for deep peelings. In: ISSA, M.; TAMURA, B. **Clinical Approaches and Procedures in Cosmetic Dermatology 2**, California: Springer, 2016. p. 1-27.
- CHEMSPIDER. **Search and Share Chemistry**. 2021. Disponível em: <http://www.chemspider.com/>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- COSMETICSINFO. **Find an ingredient**. 2021. Disponível em: <https://cosmeticsinfo.org/ingredient>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- COSMETOGUIA. **Matérias-primas**. 2021. Disponível em: <https://cosmetoguia.com.br/material/list/func>. Acesso em: 10 fev. 2021.

FDA – US FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **FDA issues final rule on safety and effectiveness of consumer hand sanitizers.** 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fdaissues-final-rule-safety-and-effectiveness-consumer-hand-sanitizers>. Acesso em: 17 dez. 2020.

FISCHER, T. C. *et al.* Chemical peels in aesthetic dermatology: an update 2009. **Journal Compilation - European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 3, p. 281-292, 2010.

FONSECA-SANTOS, B. *et al.* Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4553-4562, 2016.

FORMARIZ, T. P. *ET al.* Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FRANZEN, J. M.; SANTOS, J. M. S. R.; ZANCANARO, V. Colágeno: uma abordagem para a estética. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde – RIES**, v.2, n. 2, p. 49-61, 2013.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 113-136, 1998.

GARTNER, L. P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 576 p.

GELARDI, G. *et al.* Chemistry of chemical admixtures. **Science and Technology of Concrete Admixtures**. Cambridge: Elsevier, 2016. p. 149-218.

GEUSENS, B. *et al.* Lipid-mediated gene delivery to the skin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 199-211, 2011.

GOEL, G. *et al.* Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, v. 26; p. 279, 2007.

GOH, C-L.; LIM, J. T. E. Chemical peels. **Rook's textbook of dermatology**. Singapore: Jhon Wiley & Sons, 2016. p. 1-13.

GONSER, P. *et al.* Histological case-control study of peeling-induced skin changes by different peeling agents in surgically subcutaneous undermined skin flaps in facelift patients. **Jornal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 70, p. 1660-1665, 2017.

HETTER, G. P. An Examination of the Phenol–Croton Oil Peel: Part I. Dissecting the Formula. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, n. 1, p. 223-224, 2000a.

HETTER, G.P. An Examination of the Phenol–Croton Oil Peel: Part II. The lay Peelers and Their Croton Oil Formulas. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, n. 1, p. 240-248, 2000b.

HETTER, G. P. An Examination of the Phenol–Croton Oil Peel: Part III. The Plastic Surgeons' Hole. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, n. 1, p. 752-763, 2000c.

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**, v. 105, n. 1, p.1063-1083, 2000d.

HIROTA, B. C. K. *et al.* Phytochemistry and biological activities of genus *Jatropha*: mini-review. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2010.

HU, J. *et al.* Activation of M3 muscarinic receptor and Ca²⁺ influx by crude fraction from *Crotonis Fructus* in isolated rabbit jejunum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 136-141, 2012.

HYDE, S. T. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. Nova Iorque: Jhon Wiley & Sons, 2001. p. 299-332.

ICMBIO. **Sumário executivo do livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 2019. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/10308-hoje-22-e-o-dia-internacional-da-biodiversidade>. Acesso em: 03 fev. 2021.

ISAAC, C. *et al.* Processo de cura de feridas: cicatrização fisiológica. **Revista Médica**, v. 89, p. 125-131, 2010.

JOLY, C. A. *et al.* **1º Diagnóstico Brasileiro de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos**. São Paulo: Cubo, 2019. p.7-48.

JUNIOR, R. G. O. *et al.* Use of flavonoids in pharmaceutical industry sector: a technological forecasting study. **Revista GEINTEC**, v. 4, n. 2, p. 859-866, 2014.

JUSTO, A. S. **Caracterização química óleo de *Croton tiglium* (EUPHORBIACEAE) e avaliação do perfil dermatológico do peeling de fenol com óleo de Croton**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

JUSTO, A. S. Depth of injury of Hetter's phenol-croton oil chemical peel formula using 2 different emulsifying agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 82, n. 6, p. 1544-1546, 2020.

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

KASS, L. G.; RULLAN, P. P.; BRODY, H. J. Clinical preliminary evaluation of PEG-80 sorbitan laurate (Novisol) versus sodium C14-16 olefin sulfonate & triclosan (Septisol) in deep-peeling Hetter formulas. **Journal of the American Academy of Dermatology**, p. e255-e256, 2020.

KHAN, J. *et al.* Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. **Journal of Control Release**, v. 168, p. 50-60, 2013.

KIM, M. *et al.* Crotonis Fructus and Its Constituent, Croton Oil, Stimulate Lipolysis in OP9 Adipocytes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p.1-5, 2014.

LANDAU, M. Cardiac Complications in Deep Chemical Peels. **Dermatologic Surgery**, v. 33, n. 2, p. 190-193, 2007.

LARSON, D. L.; KARMO, F.; HETTER, G. P. Phenol–Croton Oil Peel: Establishing an Animal Model for Scientific Investigation. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 29, n. 1, p. 47-53, 2009.

LEE, K. C. *et al.* Basic chemical peeling: Superficial and medium-depth peels. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 81, n. 2, p. 313-324, 2019.

LEONARDI, G. R.; MATHEUS, L. G. M. Penetração cutânea. In: LEONARDI, G. R.; MATHEUS, L. G. M.; KUREBAYASHI, A. K. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo: Livraria Editora Medfarma, 2005. Cap. 2. p. 13-31.

MALMSTEN, M. Surfactants and polymers in drug delivery. In: MALMSTEN, M. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2002. 348p.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. C.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, R-A.; GUERRA-TAPIA, A. Aesthetic dermatology and emotional well-being questionnaire. **Journal of Cosmetology and Dermatology**, v. 13, p. 336-345, 2014.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; SANTOS, A. S. A pele na pessoa idosa. **Journal of Aging and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2013.

NEITZKE, I. C. *et al.* Translational research on the role of formula stability in Hetter's Phenol- Croton oil peels: analysis of chemical studies and clinical outcomes from a randomized, double-blinded, split-face controlled trial. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 84, n. 3, p. 854-856, 2021.

NISHIKI, K. *et al.* Croton oil-induced hemorrhoid model in rat: comparison of anti-inflammatory activity of diflucortolone valerate with other glucocorticoids. **Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica**, v. 92, n. 4, p. 215-225, 1988.

OLIVEIRA, E. C. V. *et al.* Natural brazilian raw material to develop o/w emulsions containing lamellar gel phase (development and analysis of emulsion with vegetable oils). **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, p. 1656-1662, 2013.

OLIVEIRA, D. A. J. *et al.* Associating chitosan and microemulsion as a topical vehicle for the administration of herbal medicines. **Carbohydrate Polymers**, v. 255, p. 1-9, 2021.

OTTO, A.; PLESSIS, J.; WIECHERS, J. W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 1-19, 2009.

OYAFUSO, M. H. *et al.* Development and in vitro evaluation of lyotropic liquid crystals for the controlled release of dexamethasone. **Polymers**, v. 330, n. 9, p. 1-16, 2017.

PAGANI, A. *et al.* An improved preparation of phorbol from croton oil. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 13, p. 1361–1367, 2017.

PATHAK, A.; MOHAN, R.; ROHRICH, R. J. Chemical Peels: Role of Chemical Peels in Facial Rejuvenation Today. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 145, n. 1, p. 58e-66e, 2020.

PORTAL BRASILEIRO DE DADOS ABERTOS. **Lista de Espécies da Flora do Brasil 2015 - Brazilian Flora Checklist**. 2020. Disponível em: <https://dados.gov.br/dataset/floradobrasil>. Acesso em 03 fev. 2021.

RAPALLI, V. K. *et al.* Insights of lyotropic liquid crystals in topical drug delivery for targeting various skin disorders. **Journal of Molecular Liquids**, v. 315, p. 1-12, 2020.

RUIVO, A. P. **Envelhecimento Cutâneo: fatores influentes, ingredientes ativos e estratégias de veiculação**. 2014. Dissertação (Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 229-250, 2001.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2. ed., São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 1006-33.

SARI, M. H. M. *et al.* Biochemical and histological evaluations of anti-inflammatory and antioxidant p-chloro-selenosteroid actions in acute murine models of inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 781, p. 25–35, 2016.

SCHERER, J. N. *et al.* Transtornos psiquiátricos na medicina estética: a importância do reconhecimento de sinais e sintomas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 32, n. 4, p. 586-593, 2017.

SIBBR. **Flora do Brasil 2020**. 2019. Disponível em: <https://collectory.sibbr.gov.br/collectory/public/show/dr66>. Acesso em: 03 fev. 2021.

SILVA, P. B. *et al.* Structural features and the anti-inflammatory effect of green tea extract-loaded liquid crystalline systems intended for skin delivery. **Polymers**, v. 30, n. 9, p.1-15, 2017.

SOUTOR, C.; HORDINSKY, M. **Dermatologia Clínica**. 1. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017. 376 p.

STONE, P. A. The use of modified phenol for chemical face peeling. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 25, p. 21-43, 1998.

STONE, P. A.; LEFER, L. G. Modified phenol chemical face peels: Recognizing the role of application technique. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, n. 9, p. 351-376, 2001.

SWINDLE, M. M.; HEPBURN, B. J. S. Suine as models in experimental surgery. **Journal of Investigative Surgery**, v. 1, p. 65-79, 1988.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 184 p.

TRUCHUELO, M.; CERDÁ, P.; FERNÁNDEZ, L. F. Chemical Peeling: A Useful Tool in the Office. **ACTAS Dermo-Sifiliográficas**, v. 108, p. 315-322, 2016.

TRUPPMAN, E. S. Major electrocardiographic changes during chemical face peeling. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 63, n. 1, p. 44-8, 1979.

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**, v. 94, n. 1, p. 60-66, 2004.

VELASCO, M. V. R. *et al.* Rejuvenescimento da pele por *peeling* químico: Enfoque no PF. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 1, p. 91-9, 2004.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**, 4. ed. Porto Alegre: ARTMED Editora Ltda, 2014. 1171 p.

WAMBIER, C. G. *et al.* Advanced chemical peels: phenol-croton oil peel. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2018.

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

WEISSLER, J. M. *et al.* The Evolution of Chemical Peeling and Modern-Day Applications. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 140, n. 5, p. 920-929, 2017.

YOKOMIZO, V. M. F. Chemical peels: review and practical applications. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 1, p. 58-68, 2013.

ZHANG, L. *et al.* Self-emulsifying drug delivery system and the applications in herbal drugs. **Drug Delivery**, v. 22, n. 4, p. 475-486, 2015a.

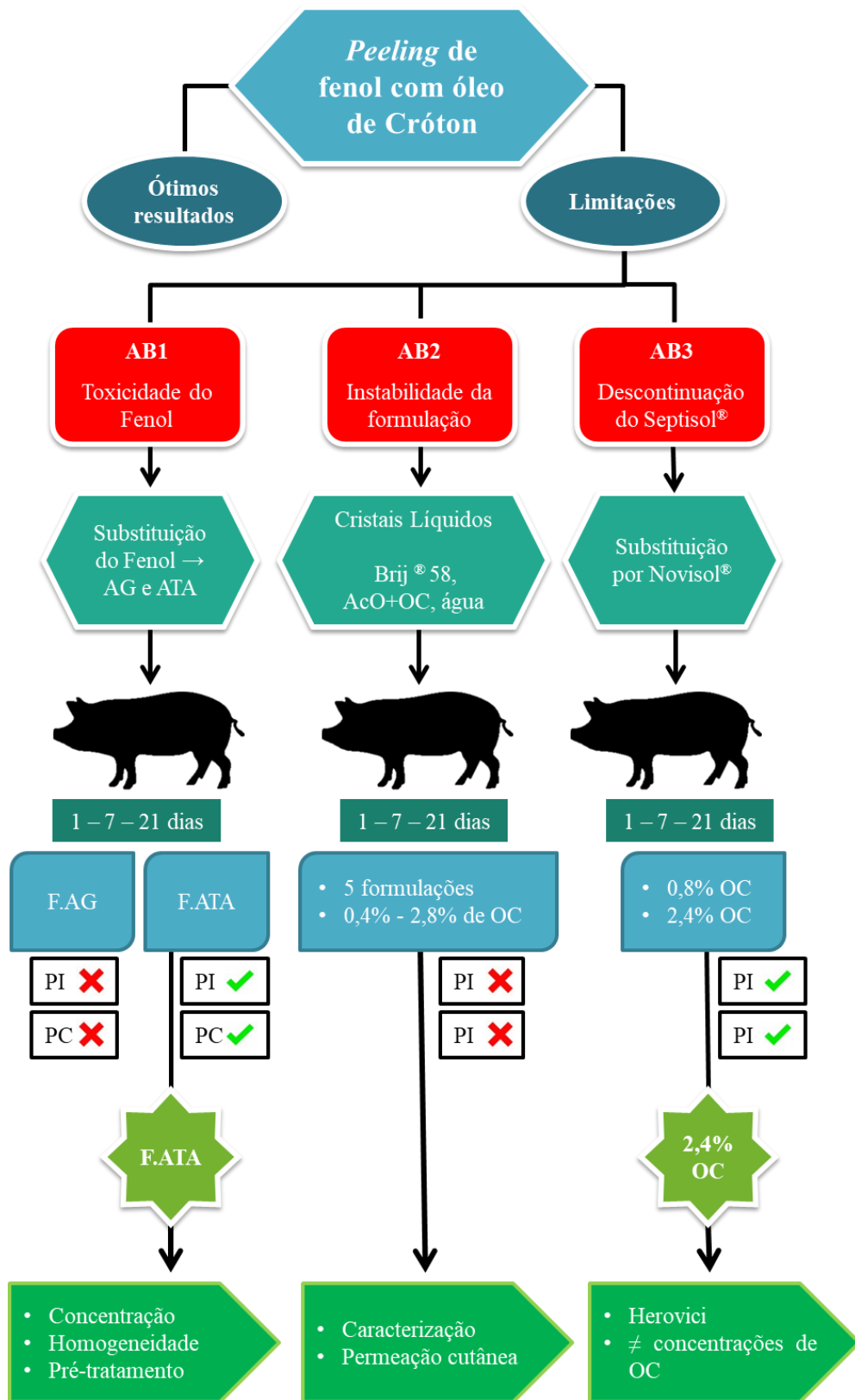
ZHANG, D. *et al.* Cytotoxic tiglane-type diterpenoids from *Croton tiglium*. **Tetrahedron**, v. 71, n. 52, p. 9638-9644, 2015b.

ZHANG, X. L. *et al.* Cytotoxic phorbol esters of *Croton tiglium*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 5, p. 858-864, 2013.

ZHANG, X.-L. *et al.* Four new phorbol diesters from *Croton tiglium* and their cytotoxic activities. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 82-86, 2016.

ZHENG, Y. *et al.* Sugar fatty acid esters. *In*: AHMAD, M. U.; XU, X. **Polar Lipids**. Shanghai: Elsevier, 2015. p. 217-241.

APÊNDICE A – Resumo Gráfico



Fonte: A autora.

Nota: AB1 – abordagem 1; AB2 – abordagem 2; AB3 – abordagem 3; AG – ácido glicólico; ATA – ácido tricloroacético; AcO – ácido oleico; OC – óleo de Croton; F.AG – formulação com AG em substituição ao fenol; F.ATA – formulação com ATA em substituição ao fenol; PI – sugestivo de resposta inflamatória; PC – aumento da produção de colágeno total.

**APÊNDICE B - CHARACTERIZATION OF THE ACTIVITY OF *Croton tiglium* OIL
IN HETTER'S VERY HEAVY PHENOL-CROTON OIL CHEMICAL PEELS**

Autores: Aline S. Justo, **Bruna M. Lemes**, Bruna Nunes, Kevin A. Antunes, Anna Claudia M. O. Capote, Leandro C. Lipinski, Eduardo B. Campagnoli, Janaina Emiliano, Eduardo C. Meurer, Ogechi Ezemma, Helio A. Miot, Flávio L. Beltrame, Carlos G. Wambier.

Revista: Dermatologic Surgery

Fator de Impacto: 2.567

Ano: 2020

Characterization of the activity of *Croton tiglium* oil in Hetter's very heavy phenol-croton oil chemical peels

Aline S. Justo, PharmD, MSc₁, Bruna M. Lemes PharmD, MSc₁, Bruna Nunes PharmD₁, Kevin A. Antunes, PharmD₁, Anna Claudia M. O. Capote, PharmD₁, Leandro C. Lipinski, VetD, PhD₂, Eduardo B. Campagnoli, DMD, PhD₃, Janaina Emiliano, MSc₄, Eduardo C. Meurer, ChemD, PhD₅, Ogechi Ezemma, BA₆, Helio A. Miot, MD, PhD₇, Flávio L. Beltrame, PharmD, PhD₁, Carlos G. Wambier, MD, PhD₆*

¹Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil.

²Department of Medicine, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil.

³Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil.

⁴Laboratory of Research of SEBISA, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil.

⁵Laboratory Fenn of Mass Spectrometry, Federal University of Paraná, Jandaia do Sul, PR, Brazil.

⁶Department of Dermatology, The Warren Alpert Medical School of Brown University, RI.

⁷Department of Dermatology and Radiotherapy, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.

*Corresponding author:

Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD

Department of Dermatology, Rhode Island Hospital - 593 Eddy Street, APC building, 10th Floor, Providence, RI, USA. 02903

carlos_wambier@brown.edu

Funding sources: none.

Conflicts of Interest: none declared.

IRB approval status: Approved under registry #034/2017 of the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA), State University of Ponta Grossa.

Word count: 894

References: 7

Figures: 4

Acknowledgements: The authors are grateful to the technical support of "Multi-user laboratory of Biology and Health Science Center (LABMU-SEBISA)" of State University of Ponta Grossa (UEPG), and FINEP-CT/Infra (Research Grant 02/2013).

Keywords: chemical peels; chemexfoliation; chemabrasion; phenol; croton oil; *Croton tiglium*; phorbol esters; emulsions; Hetter's formula; Baker-Gordon formula; collagen; neocollagenesis.

**APÊNDICE C - DEPTH OF INJURY OF HETTER'S PHENOL CROTON OIL
CHEMICAL PEEL FORMULA USING 2 DIFFERENT EMULSIFYING AGENTS**

Autores: Aline da Silva Justo, **Bruna Mikulis Lemes**, Bruna Nunes, Kevin Alves Antunes, Bruna Carletto, Adriana Yuriko Koga, Leandro Cavalcante Lipinski, Mario Rodrigues Montemor Netto, Eduardo Bauml Campagnoli, Flávio Luís Beltrame, Carlos Gustavo Wambier.

Revista: Journal of the American Academy of Dermatology

Fator de Impacto: 8.277

Ano: 2020

Disclosure: Mr Wright is the Director of Manufacturing of Delasco, LLC. Mr Kulesza is the president of Young Pharmaceuticals Inc. Delasco and Young Pharmaceuticals have commercial interest in chemical peeling.

IRB approval status: Not applicable.

Reprint requests: Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD, 65 Village Square Dr, Ste 201, South Kingstown, RI 02879-2292

E-mail: carlos_wambier@brown.edu

REFERENCES

1. American Society for Dermatologic Surgery. ASDS consumer survey on cosmetic procedure. 2018. Available at: <https://www.asds.net/Portals/0/PDF/consumer-survey-2018-infographic.pdf>. Accessed March 14, 2019.
2. Bridenstine JB, Dolezal JF. Standardizing chemical peel solution formulations to avoid mishaps. Great fluctuations in actual concentrations of trichloroacetic acid. *J Dermatol Surg Oncol*. 1994;20:813-816.

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.01.088>

Depth of injury of Hetter's phenol-croton oil chemical peel formula using 2 different emulsifying agents

To the Editor: Deep chemical peels consist of the application of a mixture of phenol, croton oil, water, and, historically, a handwash soap containing triclosan and sodium C₁₄₋₁₆ olefin sulfonate as the emulsifying agent (Septisol [SEP], Steris Corp, Mentor, OH).¹ Because of the US Food and Drug Administration's final rule on hand sanitizers,² which prohibits the use of triclosan, SEP was discontinued. The classic Baker-Gordon's formula³ (2.1% croton oil/49.3% phenol) and Hetter's standardized formulas (0.1%-1.6% croton oil/35% phenol) contained 5% SEP, which generated a very unstable emulsion¹ that spontaneously separated into 2 distinct layers (an upper and a lower layer) within minutes (Fig 1, A-D, right). A mild cleanser containing water, PEG-80 sorbitan laurate, benzyl alcohol, ethylhexylglycerin, and ammonium hydroxide, with pH = 11 (Novisol [NOV], Young Pharmaceuticals, Inc, Wethersfield, CT), has been adopted since 2018 by some dermatologists and plastic surgeons in phenol-croton oil peels⁴ because of improved emulsion stability (Fig 1, A-D, left).

To better understand the differences of effect between formulas in a domestic pig animal model experiment (institutional review board no. 034/2017/CEUA/UEPG), the microscopic depth of injury was evaluated in biopsies performed on the first postoperative day after the application of Hetter's

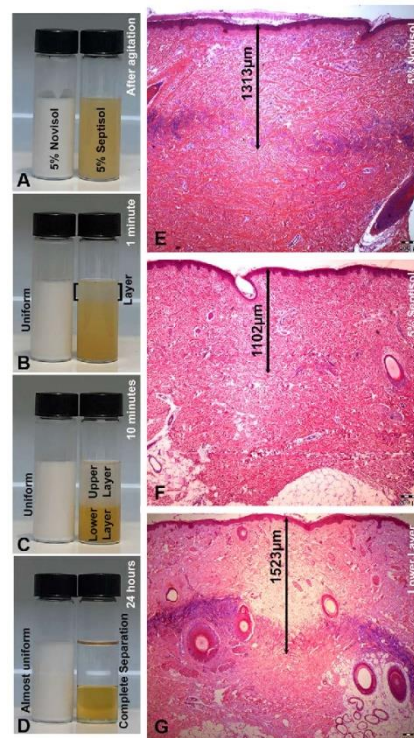


Fig 1. Hetter's 1.6% croton oil in 35% phenol (the "very heavy" formula) using 2 different emulsifying agents. Emulsion stability: the left vials (milky emulsion) contain 5% Novisol (NOV), and the right vials (orange formula) contain 5% Septisol (SEP). **A**, After immediate agitation, both formulas appear uniform. **B**, After as little as 1 minute, the formula with SEP forms a white layer on the top, depicted within brackets. **C**, After 10 minutes, the formula with SEP forms 2 distinct cloudy layers, the upper layer and lower layer, whereas the formula with NOV remains uniform. **D**, When left still, the formula with SEP completely separates into a clear upper layer and an orange lower layer within 24 hours, whereas the formula with NOV is almost uniform. **E** and **F**, Illustrative photomicrographs of the depth of injury in porcine dorsum skin biopsy samples taken 24 hours after treatment of 2 × 2-cm spots with **(E)** the formula with 5% NOV and **(F)** the formula with 5% SEP. **G**, Lower layer isolated from 5% SEP after 10 minutes. Depth of injury was measured from the top of epidermis to deepest level of the pericoagulative inflammatory band (arrows). (Hematoxylin-eosin stain; original magnification: ×40.)

"very heavy" formula containing 1.6% croton oil (Delsco, Council Bluffs, IA) and 35% phenol (Amanda Manipulações Farmacêuticas, Ponta

**APÊNDICE D - EFFECT OF INJECTION SOLUTIONS IN THE DISPERSION OF
SYRINGE LUBRICANT (SILICONE OIL)**

Autores: Bruna Mikulis Lemes, Evelyn Assis de Andrade, Luiza Stolz Cruz, Bruno Rodrigo Minozzo, Wayne D. Carey, William Damsky, Helio Amante Miot, Flávio Luís Beltrame and Carlos Gustavo Wambier.

Revista: Journal of the American Academy of Dermatology

Fator de Impacto: 8.277

Ano: 2020

2. Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI)—a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol*. 1994;19:210-216.
3. Hudak PL, Amadio PC, Bombardier C. Development of an upper extremity outcome measure: the DASH (Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand) [corrected]. The Upper Extremity Collaborative Group (UECG). *Am J Ind Med*. 1996;29:602-608.
4. Jellinek NJ, Bauer JH. En bloc excision of the nail. *Dermatol Surg*. 2010;36:1445-1450.
5. Hattori Y, Doi K, Ikeda K, Estrella EP. A retrospective study of functional outcomes after successful replantation versus amputation closure for single fingertip amputations. *J Hand Surg*. 2006;31:811-818.
6. Karle B, Wittemann M, Germann G. Functional outcome and quality of life after ray amputation versus amputation through the proximal phalanx of the index finger [in German]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2002;34:30-35.
7. Rondinelli R. *Guides to the Evaluation of Permanent Impairment*. Chicago: American Medical Association; 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.07.053>

Effect of injection solutions in the dispersion of syringe lubricant (silicone oil)



To the Editor: Silicone oil (SO) is added to most commercial syringes as a lubricant, but can contaminate injected solutions and lead to complications.¹ SO can be detected in saline from standard syringes, and agitation further increased the amount released.² The characteristics of SO droplets may be modified by agitation and also by different solutions. Deoxycholic acid, the active ingredient of Kybella (Allergan, Inc, Irvine, CA), is an emulsifier and could boost SO extraction from the walls of the syringes. The 2- to 4- μm droplets ($\sim 3\text{--}12\ \mu\text{m}^2$) undergo optimum phagocytosis,³ with subsequent granuloma formation and lymphatic transport. Larger or smaller pure droplets are deemed more inert, but may still cause adsorption and increased immunoreactivity to therapeutic proteins.⁴

The size and shape of SO droplets were evaluated in 5 solutions: saline, bacteriostatic saline, water for injection, bacteriostatic water (all from Hospira Inc, Lake Forrest, IL), and Kybella. A negative control, glass syringe (Artiglass, Padua, Italy), a positive control (Artiglass lubricated with 0.1 mL of Siluron 2000 [Fluoron GmbH, Ulm, Germany]), and 3 brands of lubricated syringes: 1 mL Luer-Lok (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 1 mL Luer-Lok (Saldanha Rodrigues, Manaus, Brazil), and 1 mL Luer-Slip (Injex, Ourinhos, Brazil) were tested for each solution under nonagitated or agitated (10 consecutive flicks with the needle side facing upward) conditions.

Syringes were filled with 0.5 mL at room temperature, and 0.1 mL was injected onto the center of a glass slide with 0.01 mL of Sudan III to highlight SO.

A fixed-position photomicrograph was taken of each sample, and droplet dispersion characteristics were compared (Fig 1). SO droplets of different sizes and shapes were detected, independent of the brand. ImageJ 1.51j8 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) was used for measurement of the shape area of stained droplets. The measurements from the 3 brands were combined for comparison among the solutions tested (Fig 2).

The solutions containing benzyl alcohol presented a larger number of 1- to 5- μm^2 droplets in the agitated samples. This phenomenon can be related with the fact that this cosolvent can contribute to decrease the polarity of the water, allowing more dispersion of SO into the solution. When deoxycholic acid was added, however, a decreased droplet area was observed, particularly after agitation. Multiple deformed droplets, showing coalescence, elongation, and disrupted droplets (Fig 1) were present.

SO was dispersed in all injectable solvents tested with a wide range of droplet size, suggesting that the SO from syringes might lead to unpredictable local reactions in dermatologic injections. The deformation of droplets in the deoxycholic acid group suggests that this compound acts as an emulsifier for SO, with the possibility of increased removal of lubricant from the syringe walls. Lubricant contamination has been well-reported in ophthalmologic literature, and other specialties should become aware to diagnose specific SO reactions.⁵ Clinically significant reactions may be dose-related to SO. Given the risks associated with SO immunoreactivity and the lack of an elimination mechanism, the use of SO lubricated syringes should be re-evaluated. Disposable SO-free syringes are available, such as Norm-Ject (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Germany), and the flush technique has also been reported to decrease contamination.²

Bruna Mikulis Lemes, PharmD, MSc,^a Evelyn Assis de Andrade, PharmD,^a Luiza Stolz Cruz, PharmD, MSc,^a Bruno Rodrigo Minozzo, PharmD, MSc,^a Wayne D. Carey, MD,^{b,c} William Damsky, MD, PhD,^d Helio Amante Miot, MD, PhD,^e Flávio Luís Beltrame, PharmD, PhD,^a and Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD^d

From the Department of Pharmaceutical Science, State University of Ponta Grossa, Brazil^a; the Department of Dermatology, McGill University^b and Carey Wang Dermatology & Dermatologic Surgery Centre,^c Montreal, Quebec, Canada; the Department of Dermatology, Yale University

**APÊNDICE E - FLUSH TECHNIQUE TO MINIMIZE ADVERSE REACTIONS
FROM SYRINGE LUBRICANT (SILICONE OIL)**

Autores: Carlos Gustavo Wambier, Evelyn Assis de Andrade, Luiza Stolz Cruz, Bruna Mikulis Lemes, Wayne D. Carey, Bárbara de Paula Silveira Moura, Alessandro Soares Both, Sarah Perillo de Farias Wambier e Flávio Luís Beltrame.

Revista: Journal of the American Academy of Dermatology

Fator de Impacto: 8.277

Ano: 2019

Flush technique to minimize adverse reactions from syringe lubricant (silicone oil)



Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD,^{a,b} Evelyn Assis de Andrade, PharmD,^c Luiza Stolz Cruz, PharmD, MSc,^c Bruna Mikulis Lemes, PharmD, MSc,^c Wayne D. Carey, MD,^{d,e} Bárbara de Paula Silveira Moura, MD,^f Alessandro Soares Both, MD, MSc,^b Sarah Perillo de Farias Wambier, MD, PhD,^b and Flávio Luís Beltrame, PharmD, PhD^g
New Haven, Connecticut; Ponta Grossa, Brazil; Montreal, Canada; and Brazilia, Brazil

Key words: alopecia areata; botulinum toxin; dermal fillers; dimethicone; injections; intralesional injections; polydimethylsiloxane; silicone oil; syringe lubricant; syringes; triamcinolone.

SURGICAL CHALLENGE

A 42-year-old man presented to the office with a sclerotic depression (Fig 1, A), which was found to be a result of injections contaminated with syringe lubricant. Analysis of the syringes with normal saline revealed the presence of escaping silicone oil droplets (Fig 1, B).

SOLUTION

We present a solution to minimize lubricant contamination in injections of botulinum toxin, triamcinolone acetonide, deoxycholic acid, fillers, insulin, and bevacizumab to prevent complications, such as granulomatous reactions, sclerosing lipogranuloma,¹ and intravitreal droplets.² The removal of excessive oil might be accomplished by flushing the syringe 3 times with saline before use (Fig 1, C; Video); this practice is applicable to both reconstitution and injection syringes.

Hundreds of polydimethylsiloxane droplets were counted in samples taken from 1-mL and 3-mL Luer-Lok (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) syringes after saline was drawn into these syringes and then injected onto microscopy slides (Fig 2). This finding was also seen with our positive control: 10-mL autoclaved glass syringes (Artiglass, Padua, Italy) lubricated with 0.1 mL of ophthalmic-grade polydimethylsiloxane (Siluron 2000, Fluoron GmbH, Ulm, Germany). No oil droplets were detected in our negative control: a nonlubricated glass syringe. After 3 washes with half-syringe volumes of saline, the number of droplets were negligible (Fig 1, C; Fig 2). Agitation (flicking of the syringe) to remove air bubbles increases the number of escaping droplets of lubricant (Fig 2).

Although adopting this solution might seem impractical, this is the only approach to minimize silicone contamination for intravenous, subcutaneous, intramuscular, and particularly intraocular injections.

From the Department of Dermatology, Yale University School of Medicine, New Haven^a; Department of Medicine^b and Pharmaceutical Science Graduate Program,^c State University of Ponta Grossa; Department of Dermatology, McGill University, Montreal^d; Carey Wang Dermatology and Dermatologic Surgery Centre, Montreal^e; Barbara Moura Dermatology Clinic, Brazilia^f; and Department of Pharmaceutical Science, State University of Ponta Grossa.^g
 Funding sources: None.

Conflicts of interest: None disclosed.

Reprint requests: Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD, Yale University Center for Clinical Investigations, 2 Church St South, Ste 401, New Haven, CT 06519. E-mail: carlos.wambier@yale.edu.

J Am Acad Dermatol 2019;81:e169-71.

0190-9622/\$36.00

© 2018 by the American Academy of Dermatology, Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.12.014>

APÊNDICE F - CHITOSAN/NANOCELLULOSE-BASED BIONANOCOMPOSITE FILMS FOR CONTROLLED BETAMETHASONE AND SILVER SULFADIAZINE DELIVERY

Autores: Bruno Vincenzo Fiod Riccio, Ana Beatriz Klosowski, Eduardo Prestes, Taynara Barbosa de Sousa, Laís Caroline de Assunção Moraes, **Bruna Mikulis Lemes**, Flávio Luís Beltrame, Patrícia Mazureki Campos, Priscileila Colerato Ferrari.

Revista: Journal of Applied Polymer Science

Fator de Impacto: 2.520

Ano: 2019

Chitosan/nanocellulose-based bionanocomposite films for controlled betamethasone and silver sulfadiazine delivery

Bruno Vincenzo Fiod Riccio^{1,2} | Ana Beatriz Klosowski² | Eduardo Prestes³ |
Taynara Barbosa de Sousa² | Laís Caroline de Assunção Moraes² |
Bruna Mikulis Lemes² | Flávio Luís Beltrame² |
Patrícia Mazureki Campos² | Priscileila Colerato Ferrari²

¹Department of Pharmaceutical Sciences, State University of São Paulo – UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil

²Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

³Department of Materials Engineering, State University of Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

Correspondence

Priscileila Colerato Ferrari, PhD,
Department of Pharmaceutical Sciences,
State University of Ponta Grossa, 4748
General Carlos Cavalcanti Avenue, Ponta
Grossa, PR 84030-900, Brazil.
Email: priscileila@hotmail.com and
pcferrari@uepg.br

Abstract

Bionanocomposite films based on chitosan and nanocellulose (nanocrystals or nanofibrils) have gained considerable attention for biomedical applications, especially for wound dressings. However, the development of these films as controlled drug release dressings is still under-exploited. Therefore, this work aimed to design chitosan/nanocellulose-based bionanocomposite films, loaded by betamethasone or silver sulfadiazine, as functional dressings. The films were obtained by solvent casting and characterized by physicochemical, mechanical, barrier properties, in vitro drug release, and antimicrobial activity. The nanocellulose type, physical state, and content caused influence on the film's properties providing different physical, barrier, and drug release profiles. They are semi-occlusive and mechanically resistant; the drug release is controlled, and possesses antimicrobial activity. In conclusion, the developed biodegradable bionanocomposite films are promising as active dressings for controlled drug delivery in the wound site and have specific applications according to their features to treat inflamed and purulent wounds, non-infectious dry wounds, and infectious wounds.

KEYWORDS

biomedical applications, biodegradable, drug delivery systems

1 | INTRODUCTION

Environmental sustainability requirements have resulted in a great interest in finding new medical application materials derived from natural resources, biodegradable, and environmentally friendly.^{1,2} Cellulose and chitosan are the most abundant biopolymers on earth. Besides that, they possess physicochemical similarities and biocompatibility. These are essential features to investigate alternatives to obtain biodegradable materials with adequate properties for medicine.^{3–7}

Chitosan-based wound dressings offer many advantages due to the chitosan established bio-properties.⁸ They can interact with many cellular processes during wound healing, accelerate the process, and decrease healing time.^{9–12} Additionally, chitosan also is used as a controlled drug delivery vehicle at wound sites. This bioadhesive polymer can adhere to mucosal epithelial surfaces, thereby prolonging contact time and extending drug release.^{13–17}

Despite these biological features, chitosan-based films possess naturally limited barriers and mechanical

**APÊNDICE G - CYTOTOXIC BIOMONITORED STUDY OF *Euphorbia umbellata*
(PAX) BRUYNS**

Autores: Livia Eidam Camargo Luz, Carla Cristine Kanunfre, Katia Sabrina Paludo, Aline da Silva Justo, Victor Kubaski Petry, Bruna Mikulis Lemes, Andersson Barison, Angelita Nepel, Mei Wang, Bharathi Avula, Ikhlas Ahmad Khan, Flávio Luís Beltrame.

Revista: Journal of Ethnopharmacology

Fator de Impacto: 3.690

Ano: 2016



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jepCytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

Livia Eidam Camargo Luz^a, Carla Cristine Kanunfre^b, Katia Sabrina Paludo^b,
Aline da Silva Justo^a, Victor Kubaski Petry^a, Bruna Mikulis Lemes^a, Andersson Barison^c,
Angelita Nepel^c, Mei Wang^d, Bharathi Avula^d, Ikhlas Ahmad Khan^{d,e},
Flávio Luís Beltrame^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Science, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil^b Department of General Biology, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil^c Nuclear Magnetic Resonance Centre, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil^d National Centre for Natural Products Research, University of Mississippi, Oxford, MS, USA^e Division of Pharmacognosy, Department of Biomolecular Sciences, School of Pharmacy, University of Mississippi, Oxford, MS, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2015

Received in revised form

30 January 2016

Accepted 19 February 2016

Available online 22 February 2016

Keywords:

Euphorbia umbellata

Cancer

Cytotoxic activity

Euphol

Germanicol acetate

GC-MS

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Euphorbia umbellata* latex (sap) has normally been used in folk medicine in southern Brazil to treat different types of cancers.

Aim of study: To carry out a biomonitored investigation of partitioned latex using *in vitro* assay, to identify the main mechanisms related with the action of the most active fraction as well as to develop a phytochemical study with this material.

Materials and methods: Biological screening was performed with hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol fractions from the latex of *E. umbellata* using MTT, trypan blue, and neutral red assays to determine the cytotoxicity against HRT-18, HeLa and Jurkat cells and flow cytometry, DNA quantification, acridine orange and Hoechst 33342 staining to investigate mechanisms of action for the hexane extract. The phytochemical study of the hexane fraction was performed by chromatographic procedures and the substances were identified by NMR analysis. The isolated terpenes were evaluated using MTT to determine the cytotoxicity against Jurkat cells.

Results: All the fractions presented concentration and time dependent cytotoxicity. The hexane fraction showed the highest cytotoxicity; whereas the Jurkat cell was the lineage with the highest sensitivity (IC₅₀ 1.87 µg/mL). Fragmentation of DNA and apoptosis are two mechanisms related with the toxicity of hexane fraction. The hexane fraction arrested the cell cycle in the G0/G1 phase, and the selectivity index was 4.30. Phytochemical study of the hexane fraction led to isolation of euphol (main compound) and germanicol acetate. Both substances demonstrated some slight cytotoxic activity against Jurkat cells after 72 h; however the activity was minimal compared to vincristine (anticancer standard drug).

Conclusion: The current research proves that the fractions of the latex from *E. umbellata* have a cytotoxic effect against three different cancer cells lines. The hexane fraction showed high *in vitro* cytotoxic effects against Jurkat cells demonstrating that the effect may be due to non-polar constituents. The two isolated terpenes (euphol and germanicol acetate) showed poor cytotoxic activity indicating that the anticancer properties of the extract may be caused by other substances present in the hexane fraction.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is a disease with a great worldwide prevalence that is characterized by a rapid, uncontrolled, and potentially invasive cellular growth (INCA, 2014; Ochwang'i et al., 2014). The main causes for this development are generally considered to be life

style and genetic predisposition (De Almeida et al., 2005). Statistical data demonstrate that this disease presents one of the highest mortality indices. More than 8.2 million deaths occur annually around the world, and this number could reach 21.4 million in 2030 (INCA, 2014; WHO, 2014). In Brazil among the 10 most important types of cancer are leukemia, cervix and colorectal cancer (INCA, 2014).

In an attempt to find medicines more efficient for the treatment of different types of cancer, medicinal plants and ethnopharmacological

* Corresponding author.

E-mail address: flaviobeltra@gmail.com (F.L. Beltrame).<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.025>

0378-8741/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**APÊNDICE H - ANTI-ULCER MECHANISMS OF POLYPHENOLS EXTRACT OF
Euphorbia umbellata (PAX) BRUYNS (EUPHORBIACEAE)**

Autores: Bruno Rodrigo Minozzo, Bruna Mikulis Lemes, Aline da Silva Justo, Jheniffer Ellen Lara, Victor Emanuel Kubaski Petry, Daniel Fernandes, Caroline Belló, José Carlos Rebuglio Velloso, Eduardo Bauml Campagnoli, Otalíbio Castiglione Nunes, Rodrigo Rezende Kitagawa, Bharathi Avula, Ikhlas Ahmad Khan, Flávio Luis Beltrame.

Revista: Journal of Ethnopharmacology

Fator de Impacto: 3.690

Ano: 2016



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae)



Bruno Rodrigo Minozzo^{a,*}, Bruna Mikulis Lemes^a, Aline da Silva Justo^a, Jheniffer Ellen Lara^a, Victor Emanuel Kubaski Petry^a, Daniel Fernandes^a, Caroline Belló^b, José Carlos Rebuglio Velloso^b, Eduardo Bauml Campagnoli^c, Otalíbio Castiglione Nunes^d, Rodrigo Rezende Kitagawa^d, Bharathi Avula^e, Ikhlal Ahmad Khan^e, Flávio Luis Beltrame^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa 84900–030, Paraná, Brazil

^b Department of Clinical and Toxicological Analysis, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa 84900–030, Paraná, Brazil

^c Department of Odontology, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa 84900–030, Paraná, Brazil

^d Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória 29040–090, Espírito Santo, Brazil

^e National Center for Natural Products Research, University of Mississippi, Oxford 38677, MS, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2016

Received in revised form

17 May 2016

Accepted 9 June 2016

Available online 11 June 2016

Keywords:

Anti-ulcer

Nitric oxide

Prostaglandins

Glutathione

Antioxidant

Phenolic compounds

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Euphorbia umbellata* (leitosinha) is used in southern Brazilian folk medicine to treat gastric problems, as well as for its analgesic and anti-inflammatory properties.

Aim of study: To evaluate the anti-ulcer effects of methanolic bark fraction (MF) against *in vivo* and *in vitro* assays, as well as an antioxidant, antibacterial and chromatographic study of this fraction.

Materials and methods: *In vivo* anti-ulcer activity was performed using ethanol and indomethacin models with different MF concentrations (50, 100 or 200 mg/Kg). The stomachs of the animals were applied to histological evaluation, and the serum to evaluate the ABTS^{•+} radical capture. The 200 mg/Kg dose was used to analyze the mechanisms involved in antiulcerogenic properties of methanolic fraction. The *in vitro* activity was performed using several different antioxidant assays, in addition to anti-*Helicobacter pylori* and anti-urease experiments. The chromatographic study was carried out by LC-MS analysis.

Results: Pharmacological investigation of the MF showed an anti-ulcer potential in ethanol and indomethacin *in vivo* assays. The material presented a high antioxidant activity for several oxidant *in vitro* systems (DPPH[•], ABTS^{•+}, O₂^{•−}, HOCl, TauCl and HRP), as well as an ABTS^{•+} capture increasing (7.5%) by the treated animals serum (when compared to the negative control). Prostaglandins, nitric oxide/ cyclic guanosine monophosphate pathway and involvement of the protein components of the glutathione complex are some of the mechanisms related with this potential anti-ulcer action. The histological examination of the stomachs of the animals showed that the MF also prevents local action of offensive agents. Chemical analysis using LC-QTOF-MS revealed the presence of ellagic and gallic acid derivatives and flavonols.

Conclusion: The findings provide scientific basis to the ethnopharmacological purpose of the studied plant and the biological activities of MF of *E. umbellata* stem bark may be due to the presence of phenolic compounds.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The etiology of gastric ulcers is not fully understood; however, it is generally accepted that it results from an imbalance between aggressive factors (oxidative stress, ethanol consumption,

nonsteroidal anti-inflammatory (NSAID) drugs abuse, *Helicobacter pylori* infection, etc.) and endogenous defense mechanisms (efflux of mucus and bicarbonate, increasing of antioxidant levels, prostaglandins, nitric oxide, sulfhydryls and others) (Júnior et al., 2014; Wallace, 2008; Yuan et al., 2006).

The available therapies include protons pump inhibitors (PPI), antibiotics, histamine receptor antagonists, prostaglandins analogues, and gastroprotective drugs (Chan and Leung, 2002; Malfertheiner et al., 2009).

Currently, PPI along with antibiotics are the most effective medication used for treat gastric ulcer *H. pylori* positive, but some

* Corresponding authors at: Laboratory of Natural Products Research, Department of Pharmaceutical Science, State University of Ponta Grossa, General Carlos Cavalcanti Avenue, 4748, Ponta Grossa 84030-900, Paraná, Brazil.

E-mail addresses: brunominozzo@outlook.com (B.R. Minozzo), flaviobeltra@gmail.com (F.L. Beltrame).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.032>

0378-8741/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.