

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

ALINE DA SILVA JUSTO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE *Croton tiglium* (EUPHORBIACEAE) E
AVALIAÇÃO DO PERFIL DERMATOLÓGICO DO *PEELING* DE FENOL COM ÓLEO
DE CROTON

PONTA GROSSA

2019

ALINE DA SILVA JUSTO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE *Croton tiglium* (EUPHORBIACEAE) E
AVALIAÇÃO DO PERFIL DERMATOLÓGICO DO *PEELING* DE FENOL COM ÓLEO
DE CROTON

Dissertação apresentado para a obtenção do título
de Mestre na Universidade Estadual de Ponta
Grossa, área de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Luís Beltrame

PONTA GROSSA

2019

J96 Justo, Aline da Silva
Caracterização química do óleo de Croton tiglium (Euphorbiaceae) e avaliação do perfil dermatológico do peeling de fenol com óleo de Croton / Aline da Silva Justo. Ponta Grossa, 2019.
86 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Wambier.

1. Dermatologia. 2. Cromatografia gasosa. 3. Óleo de croton. 4. Colágeno. I. Beltrame, Flávio Luís. II. Wambier, Carlos Gustavo. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV. T.

CDD: 615

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2019.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 06/2019 DA MESTRANDA **ALINE DA SILVA JUSTO** REALIZADA NO DIA 28 DE FEVEREIRO DE 2019, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e oito dias de fevereiro de dois mil e dezenove, às 14h00min, no Auditório do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, sala 115 - Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Flávio Luís Beltrame reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Aline da Silva Justo, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pelos Professor Doutor Flávio Luís Beltrame (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): Eduardo Campagnoli (UEPG/PR) e Cassia G. Magalhães (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 dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

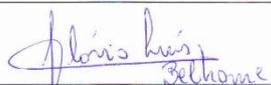
O título do trabalho foi: **“CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA ÓLEO DE CROTON TIGLIUM (EUPHORBIACEAE) E AVALIAÇÃO DO PERFIL DERMATOLÓGICO DO PEELING DE FENOL COM ÓLEO DE CROTON.”**

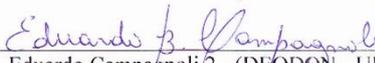
Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se aprovada a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros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

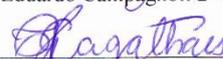
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não

Novo título: _____


Flávio Luís Beltrame 1 - (DEFAR - UEPG) Presidente


Eduardo Campagnoli 2 - (DEFAR - UEPG) – Titular


Cassia G. Magalhães 3 - (QUÍMICA - UEPG) – Titular

***“E tudo o que vocês fizerem ou
dissarem, façam em nome do Senhor
Jesus e por meio dele agradeçam a Deus,
o Pai.”***

(Colossenses 3:17 – NTLH)

Agradecimentos

Estes dois anos foram intensos e cheios de aprendizados. Portanto, é impossível não agradecer por este tempo precioso, no qual instituições e pessoas me acompanharam e me auxiliaram para que esta etapa fosse concluída com êxito.

Primeiramente, agradeço ao Autor da Vida, Deus, meu amigo de todas as horas, que me conhece intimamente e me ama incondicionalmente. Creio que grandes coisas ainda virão, o Autor da Vida me capacitou para chegar até aqui e posso engrandecer o seu Santo nome por isso. Apesar das dificuldades e momentos de lutas, Ele sempre esteve ao meu lado, me sustentando em todo o tempo.

Graças dou pela minha família, meus pais Rosângela e Marcos, que me ensinaram a ética e princípios inquebráveis para uma vida de sucesso, além de todos seus esforços para eu chegar até aqui. Minha querida irmã Tathiana, referencial de pessoa e mulher conquistadora, aquela irmã protetora que ajuda sem pedir nada em troca.

Agradeço ao meu noivo Cesar Eduardo por todo cuidado, carinho e atenção em toda esta trajetória, pelos conselhos e incentivos, por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava, por despertar a melhor versão de mim mesma.

Sou grata pelo meu orientador Dr. Flávio Luís Beltrame, que concedeu diferentes conhecimentos sobre o projeto e além de conhecimentos, deu suporte para que o projeto acontecesse de forma linear segundo o projeto inicial. Agradeço também por todo seu empenho e dedicação nos finais de semana e feriados inclusive.

Em especial agradeço à CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa, que me manteve por estes dois anos, também auxiliou para que este trabalho acontecesse.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, por ceder os laboratórios e equipamentos e pela formação acadêmica. Ao PPGCF por todo apoio e dedicação a todos os pós-graduandos.

Ao professor Dr. Leandro Lipinski e toda sua equipe pelo auxílio e desenvolvimento do método de aplicação no modelo *in vivo* do trabalho apresentado e à equipe do professor Dr. Eduardo Bauml Campgnoli e seu doutorando Leomar pelo auxílio na parte histológica do projeto.

Agradeço à *University of Mississippi* pelo desenvolvimento da análise química das amostras deste projeto por Cromatografia Gasosa aplicada ao Espectrômetro de Massa.

Em todo tempo tive amigos que se tornaram uma família, refiro-me à família do Lab-M23. Minha amiga Bruna Lemes que foi companheira de aventuras. Obrigada por me ensinar tanto e transmitir muito além de conhecimentos técnico-científicos, mas princípios de amizades. Meus queridos irmãos de laboratório Bruno, Luiza, Evelyn, Franciele e Michele. São referenciais que poderei levar para toda a vida.

Agradeço a todos os alunos de Iniciação Científica (Bruna Nunes, Kevin, Alexandre, Laura e Anna) que foram incansáveis em diversas análises do projeto, foram dedicados e se tornaram amigos. Espero ter contribuído com o aprendizado e edificado a vida de vocês.

Minha amiga Bruna Nunes, amiga antes do PIBIC, amiga na fé, obrigada por existir na minha vida e por me incentivar a ser alguém além. Obrigada pela confiança, pelo prazer da sua companhia em horas de intervalo ou no almoço.

Aos professores que foram presentes em minha vida, por todo conhecimento e suporte básico, para que hoje eu pudesse estar neste momento tão especial e importante na minha vida.

Agradeço à minha família ICP pelas orações, conselhos e palavras que em toda semana fortaleciam meu espírito em Deus e isto não me deixou desistir dos meus sonhos.

Em especial, agradeço à Pra. Adriane, que é um referencial de mulher cristã, inteligente, sábia, mulher de fé. Seus conselhos estão guardados em minha memória e levarei por toda a vida.

E por fim agradeço a tudo e todos, pois as “pessoas felizes se lembram do passado com gratidão, se alegram com o presente e enfrentam o futuro sem medos” (Epicuro).

Resumo

Na estética existem alguns métodos que são utilizados desde a antiguidade para reduzir efeitos nocivos do tempo e doenças de pele, destacando-se entre eles os chamados *peelings*. Existem diferentes graus de *peelings* aplicados hoje em dia na clínica dermatológica, podendo-se, de um modo geral, se estabelecer que quanto maior o grau de sua classificação, maior sua eficácia de resultado. Destaca-se, entre os procedimentos o *peeling* com fenol, que é conhecido por seu efeito rejuvenescedor, mas também por sua toxicidade. A fórmula proposta por Hetter no ano de 2000 foi desenvolvida como uma proposta alternativa a essa formulação, buscando-se reduzir os efeitos tóxicos associados a fórmula primária, mas também otimizar o efeito dermatológico desejado. Nessa nova proposta, se associa ao fenol o óleo de croton, que segundo a literatura, apresenta na sua composição química componentes que possuem atividade pró-infamatória, que poderiam vir a auxiliar no resultado final esperado de rejuvenescimento. Essa pesquisa tem por objetivo o estudo da fórmula de Hetter, suas fases e do óleo de croton sobre a pele, além da caracterização química por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) dessa matriz e as fases da formulação. Para isso, foi realizado um ensaio *in vivo* (modelo suíno) aplicando o controle negativo (água e Septisol®), controle positivo (água, fenol, óleo de croton e Septisol®), camada inferior (água, fenol, óleo de croton e Septisol®), camada superior (água, fenol, óleo de croton e Septisol®) e fórmula sem o fenol (água, óleo de croton e Septisol®) sobre o tecido desses animais. Após 1, 7 e 21 dias da aplicação, foram retirados os tecidos para avaliação. Os tecidos foram desidratados e diafanizados, incluídos em parafina e cortados e corados com HEROVICI e Hematoxilina-Eosina para diferenciação de colágeno tipo I e tipo III e avaliação da presença de colágeno, células e espessura do epitélio, respectivamente. Determinou-se um aumento de células no dia 1 e 21, aumento da espessura do epitélio no dia 7 e 21 e maior quantidade de colágeno tipo III no dia 21 para as amostras do controle positivo e grupo tratado com a amostra composta pela camada inferior da fórmula de Hetter. A caracterização química geral (*fingerprinting*) foi seguida de uma análise química por 3 meses visando a estabilidade química do óleo comercial utilizado no preparo da fórmula de Hetter, foram identificados no óleo de Croton 19 ácidos graxos principais. Todos os dados

químicos foram avaliados por análise quimiométrica por PCA, na qual foi identificada que durante os 3 meses avaliados, houve alterações na concentração de algumas substâncias, principalmente nos picos 3, 4 e 5 dessa matriz vegetal. Pode-se concluir, além disso, os componentes ativos da fórmula de Hetter são encontrados na camada inferior da formulação *home-made* utilizada na clínica dermatológica; que esses componentes são capazes de estimular a produção de colágeno do tipo III na derme do tecido de porcos. Por fim, pode-se inferir que os ácidos graxos (compostos majoritários dessa matriz) podem ser usados como marcadores analíticos para o controle de qualidade desse produto e que novos estudos devem ser conduzidos para se buscar identificar os componentes do óleo que seriam responsáveis pela atividade dermatológica observada.

Palavras-chaves: Dermatologia, Cromatografia Gasosa, Óleo de Croton, Colágeno.

Abstract

In aesthetics there are some methods that have been used since ancient times to reduce the harmful effects of time and skin diseases, among them the so-called peelings. There are different degrees of peeling applied nowadays in the dermatological clinic, being able, in general, to establish that the greater the degree of its classification, the greater its effectiveness of result. Among the procedures, peeling with phenol is known for its rejuvenating effect, but also for its toxicity. The formula proposed by Hetter in the year 2000 was developed as an alternative proposal to this formulation, aiming to reduce the toxic effects associated with the primary formula, but also to optimize the desired dermatological effect. In this new proposal, it is associated with phenol, the croton oil, which, according to the literature, presents in its chemical composition components that have pro-inflammatory activity, which could help the expected final result of rejuvenation. This research aims to study the Hetter formula, its phases and the croton oil on the skin, as well as the chemical characterization by gas chromatography coupled to the mass spectrometer (GC-MS) of this matrix and the phases of the formulation. For this, an *in vivo* assay (swine model) was applied applying the negative control (water and Septisol®), positive control (water, phenol, croton oil and Septisol®), bottom layer (water, phenol, croton oil and Septisol (Water, phenol, croton oil and Septisol®) and non-phenol formula (water, croton oil and Septisol®) on the tissue of these animals. After 1, 7 and 21 days of application the tissues were removed for evaluation. The tissue was dehydrated and diaphanized, paraffin embedded and cut and stained with HEROVICI and Hematoxylin-Eosin, for differentiation of type I and type III collagen and evaluation of the presence of collagen, cells and thickness of the epithelium, respectively. An increase of cells at day 1 and 21, increase of epithelium thickness at day 7 and 21 and greater amount of collagen type III at day 21 were determined for the samples of the positive control and group treated with the sample composed by the lower layer of the Hetter formula. The general chemical characterization (fingerprinting) had followed by a chemical analysis for 3 months evaluating the chemical stability of the commercial oil used in the preparation of the Hetter formula. In the Croton oil 19 fatty acids were identified. All the chemical data were evaluated by PCA chemometric analysis, in which it was identified that during the 3 months

evaluated, there are changes in the concentration of some substances, mainly in peaks 3, 4 and 5. It can be concluded that the active components of the formula of Hetter are found in the lower layer of the home-made formulation used in the dermatological clinic. Among them that these components are capable of stimulating the production of type III collagen in the pig tissue dermis. Finally, it can be inferred that fatty acids (major compounds of this matrix) can be used as analytical markers for the quality control of this product and that further studies should be conducted to identify the components of the oil that would be responsible for the activity observed.

Keywords: Dermatology, Gas Chromatography, Croton Oil, Collagen

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 01 – Microfografia da pele (HE, 40x) | 18 |
| Figura 02 – Fotomicrografia da evidenciando as camadas da epiderme (HE, 200x) | 19 |
| Figura 03 – Fotomicrografias da derme – estruturas em destaque | 21 |
| Figura 04 – Fotomicrografia da hipoderme (HE, 400x) | 22 |
| Figura 05 – Comparação visual entre envelhecimento natural (1) e fotoenvelhecimento (2) | 24 |
| Figura 06 – Estrutura química do fenol | 25 |
| Figura 07 – Formação das duas fases na fórmula de Hetter | 29 |
| Figura 08 – Efeito pós-operatório após aplicação da FH | 30 |
| Figura 09 – Representação dos núcleos principais de alguns ésteres de forbois (KIN <i>et al.</i> , 2014) | 32 |
| Figura 10 – Compostos envolvidos na síntese de diterpenos | 32 |
| Figura 11 – Formação dos forbois a partir do GGPP | 33 |
| Figura 12 – O diterpeno [phorbol (1a), 4 α -phorbol (2), 4-deoxy-4 α -phorbol (3a)] majoritário presente no OC e seus derivados | 35 |
| Figura 13 – Sistema do Cromatógrafo a gás | 37 |
| Figura 14 – Interação da amostra com a FM e FE | 38 |
| Figura 15 – Esquema do preparo da Fórmula de Hetter (2000) e camadas superior e inferior | 42 |
| Figura 16 – Modelo animal, demarcações dos spots de forma randomizada e aleatória | 43 |
| Figura 17 – Determinação da espessura do epitélio no programa Image J® .. | 44 |
| Figura 18 – Contagem dos elementos histológicos pelo programa Image J® . | 46 |
| Figura 19 – Imagens macroscópicas da pele logo após a aplicação dos tratamentos | 49 |
| Figura 20 – Espessura do epitélio entre a amostras analisadas | 50 |

| | |
|--|----|
| Figura 21 – Gráficos referente à análise dos elementos presentes no tecido analisado (ampliação de 400x) | 51 |
| Figura 22 – Fotos das amostras do 1 dia após a aplicação (ampliação de 100x) | 52 |
| Figura 23 – Amostra C+ ampliada 1000x, região do infiltrado inflamatório (HE) – biópsia após 1 dia do tratamento | 53 |
| Figura 24 – Fotos das amostras, após 7 dias da aplicação (ampliação de 100x) | 54 |
| Figura 25 – Amostra C+ (ampliada 1000x) após 21 dias do tratamento (HE, 1000x) | 54 |
| Figura 26 – Fotos das amostras após 21 dias da aplicação (ampliação de 100x) | 55 |
| Figura 27 – Fotomicrografia ampliada 100x, 24h após a aplicação da FH | 56 |
| Figura 28 – Fotomicrografia ampliada 100x, 7 dias após o tratamento com a FH (coloração HE) | 57 |
| Figura 29 – Fotomicrografia ampliada 100x, 7 dias após o tratamento com a FH (coloração HE) | 57 |
| Figura 30 – Resultado das análises realizadas por HEROVICI das amostras de 21 dias | 58 |
| Figura 31 – Microfotografia das lâminas coradas com Herovici (ampliada 400x) | 59 |
| Figura 32 – Imagem da pele tratada com o C+ (Herovici, ampliação de 1000x) | 59 |
| Figura 33 – Cromatograma do óleo de croton comercial obtido pela técnica de CG-EM | 61 |
| Figura 34 – Análise da correlação entre os picos com as componentes principais | 63 |
| Figura 35 – Variação representadas entre as amostras | 63 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 01 – Fórmula de BG (1962) e Fórmulas de Hetter (2000, d) | 28 |
| Tabela 02 – Amostras utilizadas na pesquisa e suas fórmulas | 41 |
| Tabela 03 – Procedimento da coloração de Hematoxilina e Eosina | 44 |
| Tabela 04 – Procedimento da coloração HEROVICI | 45 |
| Tabela 05 – Amostras analisadas por CG-EM | 47 |
| Tabela 06 – Ácidos graxos identificados pela técnica de CG-EM no óleo de croton comercial | 60 |
| Tabela 07 – Autovalores e porcentual da variância explicada de cada componente | 62 |
| Tabela 08 – Substâncias consideradas relevantes e presentes na CS e CI da fórmula de Hetter, comparando com a literatura | 64 |
| Tabela 09 – Compostos que estão presentes na camada superior e inferior e relatos na literatura | 70 |

Lista de abreviaturas

| | |
|--------------|--|
| BG | Baker e Gordon |
| CF | <i>Crotonis fructus</i> |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| CG-EM | Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas |
| CI | Camada inferior |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CS | Camada superior |
| C- | Controle negativo |
| C+ | Controle positivo |
| EM | Espectrômetro de massas |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FE | Fase estacionária |
| FH | Fórmula de Hetter |
| FM | Fase móvel |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| ICS | <i>International Chemometrics Society</i> |
| NF-kB | Fator nuclear kappa B |
| OC | Óleo de Croton |
| PCA | Análise do componente principal |
| PF | <i>Peeling</i> com fenol |
| SF | Fórmula sem fenol |
| UV | Ultravioleta |

Sumário

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introdução..... | 15 |
| 2 | Revisão da literatura..... | 18 |
| 2.1 | FISIOLOGIA DA PELE | 18 |
| 2.2 | PROCESSO DE ENVELHECIMENTO..... | 23 |
| 2.3 | TRATAMENTO ESTÉTICO DA PELE | 25 |
| 2.3.1 | <i>Peeling</i> profundo | 26 |
| 2.4 | EUPHORBIACEAE | 31 |
| 2.4.1 | <i>Croton tiglium</i> | 33 |
| 2.5 | CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)..... | 36 |
| 2.6 | ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA..... | 38 |
| 3 | Objetivos..... | 40 |
| 3.1 | GERAL | 40 |
| 3.2 | ESPECÍFICOS | 40 |
| 4 | Materiais e métodos..... | 41 |
| 4.1 | PREPARO DAS AMOSTRAS | 41 |
| 4.2 | AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> | 42 |
| 4.2.1 | Coloração – HE e Herovici | 43 |
| 4.2.2 | Estatística..... | 46 |
| 4.3 | AVALIAÇÃO QUÍMICA | 46 |
| 4.3.1 | CG-EM..... | 46 |
| 4.3.2 | Análise quimiométrica | 47 |
| 5 | Resultados..... | 49 |
| 5.1 | ANÁLISE <i>IN VIVO</i> | 49 |
| 5.2 | ANÁLISE QUÍMICA..... | 60 |
| 6 | Discussão | 65 |
| 7 | Considerações finais | 71 |
| | Referências..... | 72 |
| | Apêndice A – Método de análise da espessura do epitélio através do programa Image J® | 83 |
| | Apêndice B – Método de análise e contagem dos elementos teciduais através do programa Image J® | 84 |
| | Anexo A – Carta de aprovação do comitê de ética | 86 |

1 Introdução

No decorrer dos anos, tem-se percebido que o bem-estar emocional está intimamente relacionado com a estética da pele. Este fato acontece principalmente em mulheres. Pessoas que possuem doenças na pele como Acne, Lúpus Eritematoso, rosácea, Melasma, Vitiligo, além de efeitos provocados pelo tempo como manchas, linhas de expressão e rugas, tendem a ter a autoestima reduzida. Neste sentido o mercado de cosméticos e tratamentos estéticos tem crescido consideravelmente, pois as pessoas tem buscado por produtos para melhorar tais aspectos (STEPHEN; PERERA, 2014; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

Para amenizar sintomas relacionados às enfermidades ou situações decorrentes do envelhecimento, há na prática médica dermatológica a possibilidade de realização do procedimento de *peeling*. Este é assim chamado devido à aplicação de uma substância cáustica sobre a pele, causando uma destruição de forma controlada da epiderme e derme (o grau de profundidade do *peeling* depende da concentração destas substâncias). Esta destruição controlada promove um processo inflamatório na região, estimulando a reconstrução do tecido, reduzindo as imperfeições e melhorando os sintomas relacionados a muitos quadros dermatológicos (FISCHER *et al.*, 2010; VELASCO *et al.*, 2004).

O “*peeling* com fenol” (PF) é utilizado desde a Primeira Guerra Mundial (1914-1918), para tratar cicatrizes deixadas pelas batalhas, mas a fórmula proposta inicialmente para esse fim se aperfeiçoou com o tempo. Em 1960, Baker e Gordon (BG) propuseram uma formulação contendo fenol associado a um óleo obtido das sementes de uma planta chamada *Croton tiglium* (Euphorbiaceae). Nesta fórmula também eram adicionados um tensoativo (Septisol®) e água como veículo, que segundo pesquisadores levavam a resultados mais eficazes que os obtidos com a fórmula composta apenas pelo fenol (FISCHER *et al.*, 2010; VELASCO *et al.*, 2004).

No ano de 2000, Hetter fez um estudo sobre variações na formulação proposta por BG usadas em diferentes partes do mundo e propôs diferentes formulações contendo concentrações variáveis na quantidade de fenol e óleo de *C. tiglium* para serem utilizadas na clínica dermatológica. Além disso, esse pesquisador constatou que a fórmula que continha menor concentração de fenol e maior concentração do óleo apresentava melhor resultado frente ao efeito rejuvenescedor desejado (HETTER, 2000 d).

Há uma questão importante em relação ao PF que diz respeito ao fato de que o fenol é tóxico ao organismo humano. Essa substância química é absorvida e metabolizada rapidamente pelo organismo e seus efeitos são associados ao desenvolvimento de arritmia, taquicardia, contrações ventriculares prematuras e hipotensão (VELASCO *et al.*, 2004).

Isso se apresenta como uma questão importante, levando em consideração que esse *peeling* pode ser extremamente abrasivo, podendo ser utilizados em alguns casos para o tratamento de rugas profundas. Como normalmente os pacientes que fazem uso deste procedimento são idosos, e aproximadamente 15% deles apresentam problemas cardíacos, o uso dessa formulação e realização desse procedimento torna-se limitado para essa classe de usuários/pacientes devido aos riscos associados (ZASLAVSKY; GUS, 2002; VELASCO *et al.*, 2004; KADUNC; VANTI, 2009).

Tão importante quanto a questão do risco associado ao uso dessa formulação, existe a questão que trata da falta de conhecimento sobre quais dos constituintes da fórmula do *peeling* com fenol e das fórmulas de Baker e Gordon e de Hetter seria(m) a(s) responsável(is) pelo efeito: o fenol ou os constituintes químicos presentes no óleo de croton (OC)?

A resposta deste questionamento não está completamente esclarecida, porém há hipóteses. Alguns pesquisadores destacam que o fenol é que causaria a desnaturação de proteínas, induzindo um processo inflamatório que favoreceria o rejuvenescimento tecidual, sendo os demais adjuvantes da formulação apenas auxiliares na permeação do ativo (fenol), favorecendo sua ação em camadas mais profundas da pele (ZANINI, 2005; BAGATIN *et al.*, 2009).

Outra hipótese é que os constituintes do OC seriam os responsáveis pela ação pró-inflamatória, considerando que este óleo é uma matriz vegetal e que apresenta diversas classes de substâncias. Alguns estudos apontam que esta ação possa acontecer por meio dos constituintes desse óleo, e o fenol seria apenas um auxiliador na permeação dos ativos do óleo neste caso (HETTER, 2000 a).

O OC foi muito utilizado no âmbito popular pelo seu efeito laxante e abortivo principalmente na Índia. Porém, sua popularidade decaiu após os usuários perceberem os efeitos irritativos produzidos por essa matriz na pele e divulgação de estudos que descreviam os constituintes deste óleo, como por exemplo, os ésteres de forbois de núcleo tigliano, que são substâncias que apresentam efeitos pró-

tumorais, não sendo indicado a exposição crônica à este óleo (JONAS; LEVIN, 2001).

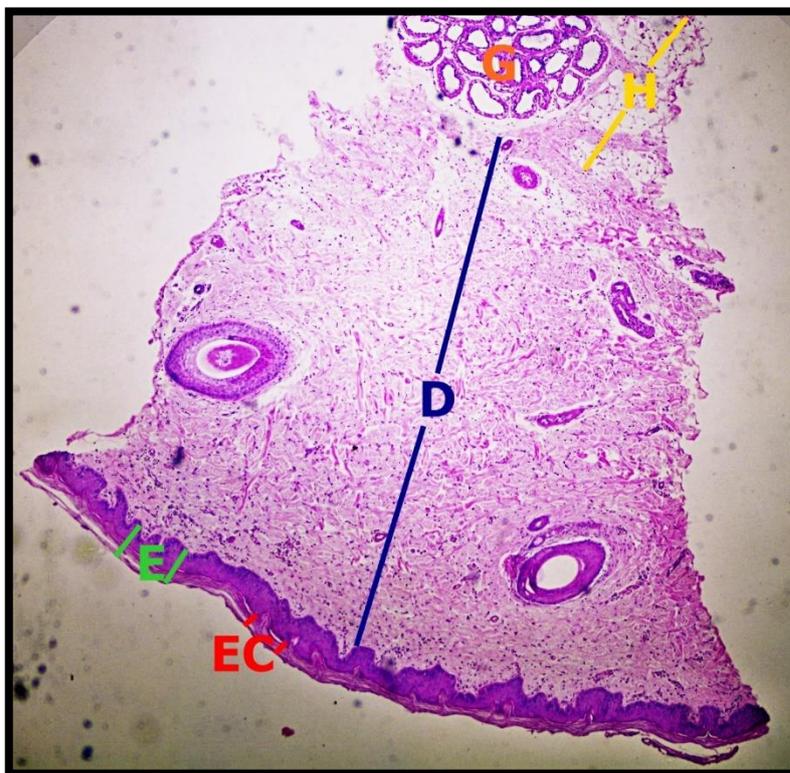
Levando em consideração esses dados, esse estudo propõe pesquisar a atividade dermatológica da fórmula de Hetter e caracterizar quimicamente o óleo de *C. tiglium* a fim de justificar o seu emprego na formulação.

2 Revisão da literatura

2.1 FISIOLÓGIA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, que apresenta como função primordial a proteção contra a perda de água, evitando a desidratação, além da proteção contra agentes nocivos, como por exemplo, microrganismos (LEONARDI *et al.* 2005). Este órgão é constituído por diferentes compartimentos, como detalhado na figura 01, e cada um possui sua importância e função.

Figura 01 – Microfotografia da pele (HE, 40x).

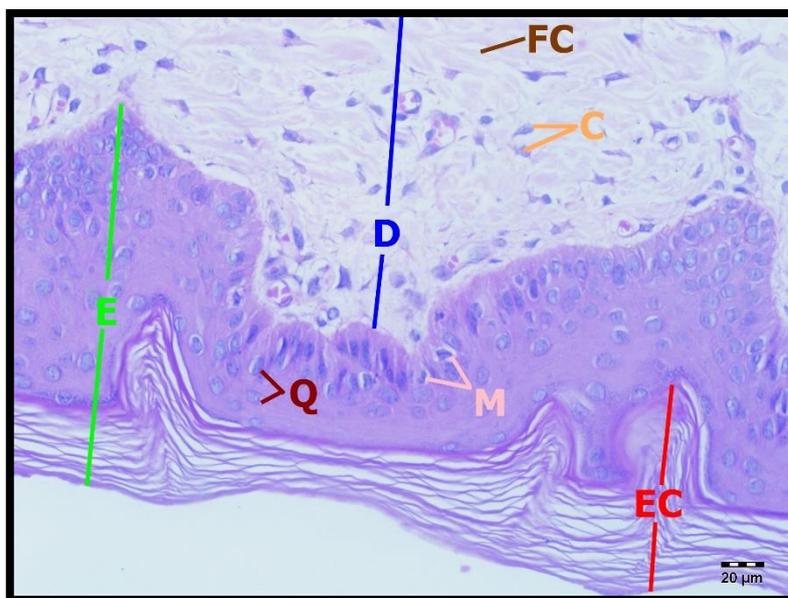


Fonte: A autora (2019).

Nota: E – epitélio; D – derme; H – hipoderme; EC – estrato córneo; G – glândulas

A epiderme (Figura 02, pág. 19) é constituída pelo estrato germinativo, estrato espinhoso, estrato granuloso, seguido do estrato lúcido e o mais superficial que é o estrato córneo. Abaixo da epiderme estão a derme e a hipoderme (BARBA, RIBEIRO, 2009).

Figura 02 – Fotomicrografia da evidenciando as camadas da epiderme (HE, 200x).



Fonte: A autora (2019).

Nota: E – epiderme; EC – estrato córneo; D – derme; FC – fibras de colágeno; C – fibroblastos; Q – queratinócitos; M – melanócitos.

O estrato córneo é a camada mais externa, formada por células epidérmicas. Estas não apresentam núcleos e mitocôndrias e não se reproduzem (são consideradas “células mortas”). O citoplasma destas células contém filamentos de queratina, no entanto, é uma barreira física importante que impede a perda de água corpórea e agressões externas, apesar de se tornar um obstáculo quando o interesse é a utilização da via tópica para a absorção de fármacos (GOODMAN, 2012).

No estrato granuloso, as células estão dispostas de forma pavimentosa, que produzem ácidos graxos livres, esses ácidos graxos são lançados para o meio extracelular, e assim promove-se uma aderência maior entre as células, formando uma barreira impermeável à água. A camada lúcida apresenta-se entre o estrato córneo e o granuloso e possui células achatadas e transparentes (HADLER; SILVEIRA, 1993; VAN DE GRAAFF, 2003).

O estrato espinhoso contém células denominadas queratinócitos, que sintetizam proteínas como a filagrina, involucrina, lorícina, as quais, favorecem a queratinização do tecido. Os queratinócitos estão dispostos em forma de poliedros unidos por desmossomos e no espaço intercelular há uma estrutura que permite a troca de substâncias hidrossolúveis do meio externo para o interno, denominado glicocálix (CARLSON, 2014).

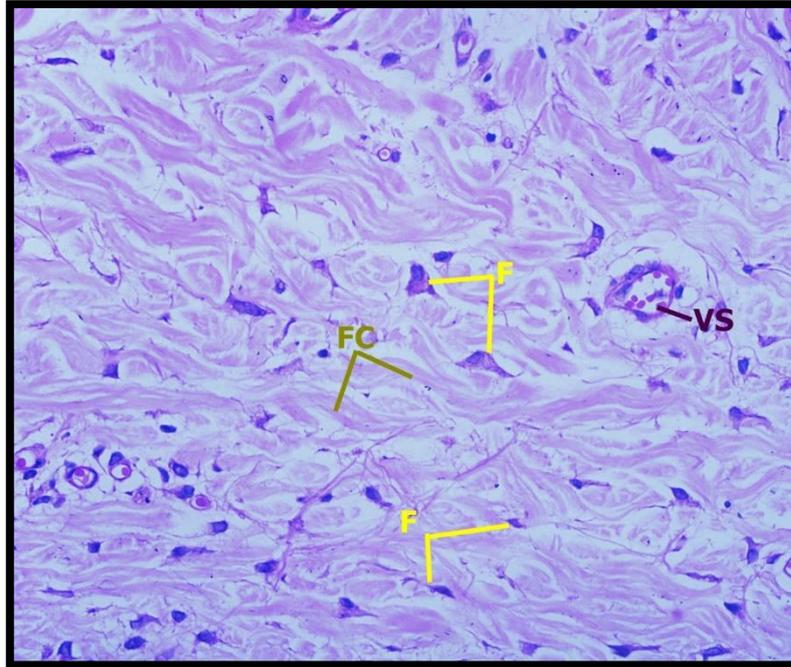
As células-tronco da epiderme estão presentes no estrato germinativo, denominado também como estrato basal. Este estrato possui os melanócitos que produzem a melanina, pigmento que fornece a cor da pele (que possui importante função) e protege o material genético contra a radiação ultravioleta (UV) (GENESER, 2003).

Logo abaixo da epiderme, encontra-se a derme (Figura 03, pág. 21) formada por um tecido conjuntivo frouxo, fibras de colágeno (que favorecem a elasticidade e a resistência), terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos. (ROSS, PAWLINA, 2012). Ela é composta por três divisões: derme papilar, derme perianexial e derme reticular (VENUS, *et al.*, 2011).

A derme papilar é rica em fibras de colágeno finas, fibras elásticas, muitos fibroblastos (células produtoras de colágeno), e possui elevada quantidade de substância fundamental. Essa estrutura permite a adesão da derme às papilas conjuntivas formadas pela epiderme (SAMPAIO; RIVITTI, 2001; VAN DE GRAAFF, 2003; VENUS, *et al.*, 2011).

Logo abaixo da derme papilar se encontra a derme perianexial que é idêntica à derme papilar. Porém é localizada em torno dos anexos presentes na pele como as glândulas. Em camadas mais profundas está a derme reticular que é constituída por fibras de colágeno mais grossas e possui menos substância fundamental e fibroblastos. A substância fundamental é constituída basicamente de mucopolissacarídeos (SAMPAIO; RIVITTI, 2001; VAN DE GRAAFF, 2003).

Figura 03 – Fotomicrografias da derme – estruturas em destaque.

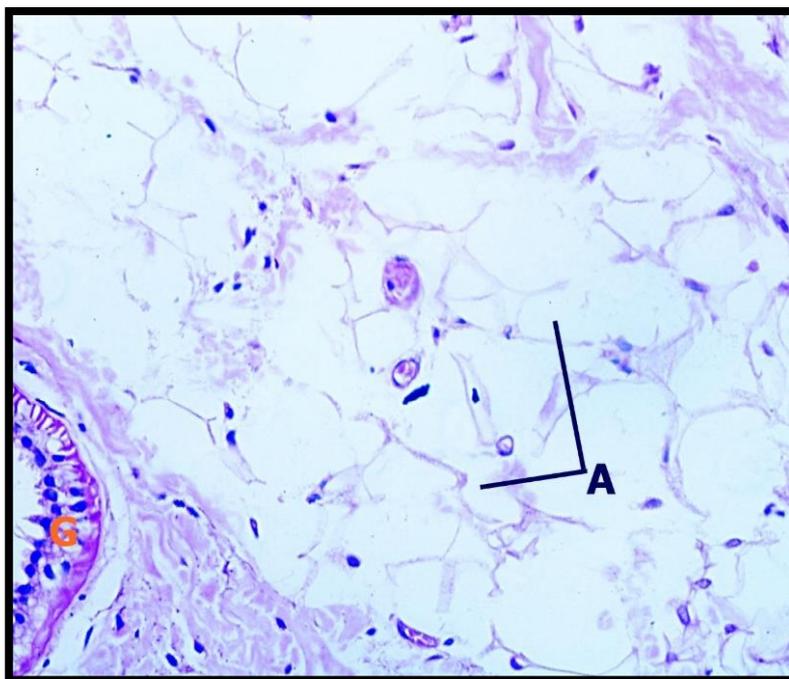


Fonte: A autora (2019).

Nota: Fibroblastos (F), fibras de colágeno (FC) e vaso sanguíneo (VS) (HE, 1000x).

Na hipoderme (Figura 04, pág. 22) concentram-se as células adiposas, que tem função principal o isolamento térmico, reserva de energia, e ainda proteção contra impactos em algumas áreas. Não é considerada como parte da pele. No entanto, é um tecido adjacente que auxilia na adesão da derme a outros órgãos próximos. Nesta porção, estão algumas glândulas sudoríparas que auxiliam na regulação da temperatura e excreção de toxinas através da liberação do suor (VAN DE GRAAFF, 2003; VENUS *et al.*, 2011).

Figura 04 – Fotomicrografia da hipoderme (HE, 400x).



Fonte: A autora (2019).

Nota: A – adipócitos; G – ducto da glândula sudorípara

As glândulas também são consideradas anexos da pele. Há três tipos: glândulas sudoríparas écrinas, glândulas sudoríparas apócrinas e glândulas sebáceas. As glândulas écrinas estão presentes em diversas regiões da pele, porém são encontradas em maior quantidade nas áreas palmares, plantares e axilas. Estas glândulas podem começar na hipoderme/derme e terminar na epiderme. A sudorese é ativada pela adrenalina, a característica do suor é basicamente água, apenas 1% é formado por sais, proteínas, lipídeos e aminoácidos. As glândulas sudoríparas apócrinas estão presentes nos folículos pilosos, diferentemente das glândulas écrinas. As apócrinas excretam açúcares, proteínas, ácidos graxos e amônia, substâncias que servem como alimento para bactérias presente na pele. Assim, o odor é característico, por causa dos produtos eliminados pela bactéria após o consumo dessas substâncias (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

Em relação às glândulas sebáceas estão presentes na vida de uma pessoa desde o nascimento, mas durante a vida o seu nível de atividade pode aumentar ou diminuir. O aumento de produção de sebo por estas glândulas acontece pela ação dos hormônios andrógenos, ou seja, no recém-nascido as glândulas são ativadas por causa dos hormônios maternos e só voltam à atividade na adolescência por causa da produção própria desses hormônios e continuam por toda vida, no caso de

mulheres, a atividade das glândulas diminui com a menopausa. Uma das consequências desse aumento na produção de sebo são as acnes (SAMPAIO; RIVITTI, 2001; TAGLIOLATTO; ENOKIHARA; ALCHORNE, 2011).

2.2 PROCESSO DE ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é um processo biológico que, em decorrência da idade, a pele passa por mudanças e alterações características morfológicas e fisiológicas. Algumas mudanças específicas são: redução da espessura da epiderme, redução da secreção de sebo pelas glândulas sebáceas, diminuição da elasticidade e glândulas sudoríparas, aumenta a fragilidade dos vasos sanguíneos, entre outras (MENOITA; SANTOS; SANTOS, 2013).

Este processo no organismo pode se desenvolver por dois tipos de fatores intrínseco (natural) e extrínseco (fatores físicos e químicos). O primeiro tipo (intrínseco), chamado também de cronológico, é resultado de fatores genéticos, idade e hormonais. Este tipo de envelhecimento considerado natural acontece pelo acúmulo, progressivo com a idade, dos radicais livres produzidos naturalmente pelo organismo, além de fatores genéticos que variam de pessoa para pessoa (RUIVO, 2014).

As primeiras consequências do envelhecimento são: a diminuição da replicação celular, diminuição da matriz dérmica e aumento de enzimas que são capazes de degradar o colágeno. O envelhecimento cronológico está diretamente relacionado a modificações no DNA. A cada divisão celular e replicação, o telômero (porção terminal do DNA) sofre um encurtamento, isto é um sistema de proteção contra mutações, evitando células cancerígenas (PARK; YEO, 2013).

As células e a estrutura da pele estão em constante mudança durante a vida. A aparência envelhecida deve-se ao fato de o organismo não conseguir produzir matriz extracelular suficiente, causa disfunção das moléculas de integrinas. Isto causa baixa adesão entre a matriz extracelular e os fibroblastos, deixando o tecido mais flácido (SKOCZYŃSKA *et al.*, 2016).

O envelhecimento extrínseco é ocasionado por fatores físicos ou químicos, por causa dos maus hábitos de vida da pessoa, principalmente pelo descuido com a pele ao se expor aos raios UV. O fotoenvelhecimento provoca pigmentação exacerbada, cor amarelada, redução da firmeza e elasticidade da pele, pele grossa

e poros abertos. Os raios ultravioletas do sol são extremamente nocivos à pele, principalmente aos tipos mais claros. Os raios UV-A são os mais agressivos, por conseguirem atingir a derme e danificar a matriz extracelular, vasos sanguíneos, DNA, lipídeos e proteínas, além de favorecer a geração de espécies reativas de oxigênio (HAN *et al.*,2014).

Outros fatores que causariam o envelhecimento são: poluição, hábito de fumar; dormir menos de 5 h/dia, dieta com baixo teor de antioxidantes, banhos longos e quentes, diabetes, obesidade, marcas de acne. No entanto, são práticas que podem ser evitadas e o envelhecimento prevenido (ADDOR, 2018).

Em geral, os sinais aparentes da pele são bem característicos, como as linhas de expressão e rugas. Linhas de expressão são dobras na pele mais finas que se formam quando a pessoa faz alguma expressão. As rugas são mais profundas e aparentes, são fixas, ou seja, mesmo sem sorrir ou apresentar qualquer expressão, a pessoa apresenta estas marcas. Pigmentação exacerbada também faz parte desses sinais, porém, este sinal é mais característico de fotoenvelhecimento. Na figura 05 está representado um comparativo entre envelhecimento natural (1) e fotoenvelhecimento (2) (RUIVO, 2014).

Figura 05 – Comparação visual entre envelhecimento natural (1) e fotoenvelhecimento (2);



Fonte: Ruivo (2014)

2.3 TRATAMENTO ESTÉTICO DA PELE

A dermatologia cuida da saúde da pele em um todo: beleza (intimamente relacionada com a aparência), proteção e higiene. Com o crescimento da procura da população para manter uma pele jovem e bonita, tem crescido na mesma proporção, o aprimoramento de técnicas de tratamentos estéticos, assim como o estabelecimento de novos procedimentos (MARTÍNEZ-GONZÁLES *et al.*, 2014).

Alguns tratamentos tópicos podem ser utilizados para prevenir e tratar estes sinais. Atualmente é o desejo de grande parte da população retardar isso. Entre estes tratamentos encontram-se os ácidos retinóicos (estas substâncias tem o poder de regular a expressão genética, por se ligarem em receptores do DNA) promovendo a produção de fibroblastos, procolágeno e inibição da síntese metaloproteinases (enzimas que degradam a matriz extracelular; ácido ascórbico (Vitamina C), poderoso antioxidante neutralizador dos radicais livres, além de promover a produção de colágeno (THOMAS *et al.*, 2013).

Além dessas substâncias, existem técnicas utilizadas para reverter alguns danos causados na pele em decorrência de fotoenvelhecimento, marcas e cicatrizes (causados por acne, por exemplo). Destaca-se o *peeling* químico, denominado também como *resurfacing* químico, quimiocirurgia e quimioesfoliação (KADUNC e VANTI, 2009; FISCHER *et al.*, 2010).

O fundamento do procedimento está na aplicação de uma substância cáustica, que irá promover a esfoliação mais profunda e controlada da epiderme, incentivar a renovação celular, regenerando a pele, adquirindo uma aparência mais jovem, com redução das manchas e sinais do envelhecimento (VELASCO *et al.*, 2004; BAGATIN *et al.*, 2009).

A classificação dos *peelings* é determinada segundo a profundidade que atinge a descamação. É considerado superficial quando a ação é apenas na epiderme, indicado em casos de Acne, Melasma, envelhecimento leve. As substâncias utilizadas são ácido tricloroacético (TCA), resorcinol, tretinoína, alfa-hidroxiácidos (VELASCO *et al.*, 2004; BAGATIN *et al.*, 2009).

O ácido gálico, um tipo de substância utilizada no *peeling* químico superficial a médio, é capaz de promover um processo de esfoliação e promove produção de colágeno e ácido hialurônico. A combinação do TCA com dióxido de carbono e resorcinol é utilizada em *peeling* de profundidade média, que atinge a derme papilar,

indicado em casos de queratoses, discromias e rugas (VELASCO *et al.*, 2004; BAGATIN *et al.*, 2009; THOMAS *et al.*, 2013). Por sua vez, no *peeling* profundo, as formulações de Baker e Gordon (BG) ou Fórmula de Hetter (FH) são utilizadas para atingir a derme reticular. Esse tipo de *peeling* é realizado quando se faz necessário lesões mais profundas para tratamento de sinais de envelhecimento assíduos (VELASCO *et al.*, 2004; BAGATIN *et al.*, 2009).

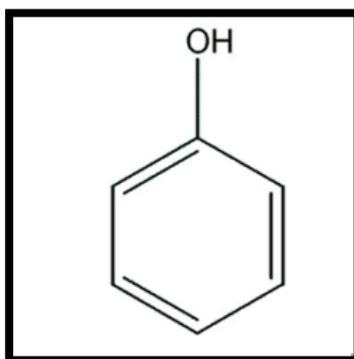
2.3.1 *Peeling* profundo

Como já citado, o PF é utilizado desde a segunda guerra mundial e foi empregado para reparo de cicatrizes causados pela guerra. Acredita-se que o fenol promove a coagulação proteica imediata na epiderme e assim, quanto mais aplicado, atinge camadas mais internas da pele, chegando à derme reticular. (VELASCO *et al.*, 2004; FISCHER *et al.*, 2009).

Assim como em qualquer procedimento, há prós e contras na utilização desse *peeling*. Apesar de ter um poder rejuvenescedor bastante acentuado, se o paciente não seguir corretamente as recomendações, após o tratamento, aparecerão manchas e marcas, além da consideração do uso do fenol na fórmula poder causar problemas de saúde por ser uma substância altamente tóxica. (VIGNERON; MUGGENTHALER, 2015).

O fenol é uma substância que tem como fórmula molecular C_6H_6O (Figura 06). É incolor ou levemente rosado, apresenta ponto de fusão a $39,5^{\circ}C$, considerado solúvel em água e altamente solúvel em álcool (EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES, 2008).

Figura 06: Estrutura química do fenol



A toxicidade é bem conhecida. Sabe-se que o fenol é absorvido rapidamente, chegando à corrente circulatória em quantidade de aproximadamente 25% do conteúdo, seja ele aplicado topicamente ou inalado. O fenol sofre metabolização, gerando água e gás carbônico e o que não é metabolizado por essa via, é conjugado com o sulfato e glucoronato, ou sofre oxidação, podendo ser excretado pelos rins (KADUNC; VANTI, 2009). Pacientes com problemas cardiovasculares não podem ter contato com essa substância, por ser altamente tóxico ao miocárdio. A farmacocinética e farmacodinâmica da ação tóxica do fenol não é muito conhecida, porém no eletrocardiograma é possível observar alterações (FISCHER *et al.*, 2010; VIGNERON, MUGGENTHALER, 2015).

Landau (2007) realizou um estudo com 181 pacientes do sexo feminino (idade média de 56 anos) que foram tratadas com PF e constatou que 6,7% das pacientes (12) sofreram arritmias cardíacas durante o procedimento, e dessas, oito mulheres tiveram que sofrer intervenção médica para retomar o estado normal.

No mesmo sentido, Kadunc e Vanti (2009) descreveram um estudo no qual 60 mulheres (divididas em quatro grupos) foram tratadas com formulações contendo diferentes concentrações de fenol. Foi observado que em todos os grupos o fenol foi excretado dentro de 8 h em média pelos rins, e não houve alteração da função renal. No entanto, em todos os grupos foram identificadas variações cardíacas, indicando que em pessoas suscetíveis, o procedimento não é recomendado.

Com o tempo, as soluções de PF foram aprimoradas na clínica médico-dermatológica. Em 1960, Baker e Gordon prepararam uma fórmula que além do fenol, continha um óleo retirado da espécie vegetal *Croton tiglium* que contém diversas substâncias por ser uma matriz vegetal e associaram esse material a uma proporção de água e Septisol® (Tabela 01, pág. 28).

Tabela 01 – Fórmula de BG (1962) e Fórmulas de Hetter (2000, d)

| Componentes | Fórmula de BG | Fórmulas de Hetter | | | | |
|------------------|--------------------------|-------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| | | <i>Very Heavy</i> | <i>Heavy</i> | <i>Medium</i> | <i>Light</i> | <i>Very Light</i> |
| Fenol (88%) | 49,3% | 35% | 33% | 33% | 33% | 27,5% |
| OC | 2,1% | 1,6% | 1,1% | 0,7% | 0,35% | 0,1% |
| Água destilada | 46% | 55% | 60,9% | 61,3% | 61,65% | 61,9% |
| Septisol® | 2,6% | 5% | 5% | 5% | 5% | 0% |
| Indicação | Casos de rugas profundas | Região perioral e nariz | | Testa e bochechas | Região periocular | Pálpebras e pescoço |
| Grau | Profundo | | | Moderado | Suave | Muito suave |

Fonte: Adaptado de Kadunc *et al.* (2009) e Wambier *et al.* (2018).

Observou-se que o resultado do *peeling* com essa formulação contendo o óleo causava uma restauração de um tecido completamente mais jovem. Algumas décadas depois, Hetter estudou variações nas concentrações de fenol e óleo de croton nas formulações para *peeling*, sugerindo algumas modificações nas concentrações desses componentes de acordo com a região de aplicação e tratamento (Tabela 1, pág. 32). Atualmente a fórmula mais utilizada é a descrita por Hetter (2000), que contém os aditivos descritos na tabela 1. Em casos extremos, a FH *very heavy* é utilizada. A fórmula com 0,7% de OC é a mais utilizada na clínica pela segurança que essa proporciona (WAMBIER *et al.*, 2018).

O preparo da fórmula é realizado da seguinte forma: primeiramente, é preparada uma solução estoque de fenol e óleo de croton (98,4% e 1,6% respectivamente). Esta solução estoque é preparada e pode ser estocada por até 6 meses para uso futuro. No dia da aplicação no paciente, essa solução é diluída em água e Septisol® (tensoativo). A mistura desses componentes leva a formação de uma solução não homogênea, devido a formação de duas fases (Figura 07, pág. 29). E a cada aplicação no paciente, o médico homogeneiza essa preparação. Este preparo acontece dentro dos consultórios dermatológicos (*home-made*) pelo próprio médico (WAMBIER *et al.*, 2018).

Figura 07 – Formação das duas fases na fórmula de Hetter.



Fonte: Imagem cedida por John Kulesza (Young Pharmaceuticals Inc. Wethersfield-CT, Estados Unidos da America - johnk@youngpharm.com)

Os óleos possuem alto potencial de degradação por oxidação, principalmente quando estes apresentam alto teor de gordura insaturada. As duplas ligações, presentes nas moléculas reagem com o oxigênio, formando radicais livres, alterando a composição química desta matriz, por causa dessas reações, irá alterar o tempo de prateleira da solução estoque, que contém o OC (OLIVEIRA, 2018).

Além do mais, a fórmula de Hetter (FH) é pouco estudada. Entretanto, alguns artigos relatam que seus componentes auxiliam a permeação cutânea do fenol, proporcionando a formulação a atingir níveis maiores de profundidade, tornando-a mais efetiva (ODO; CHICHIERCHIO, 1998; STONE, 1997). Reforçam ainda esse pensamento, Velasco e colaboradores (2004), Vigneron e colaboradores (2016), Kadunc e colaboradores (2009) que também acreditam que o fenol seja o causador do processo de quimioesfoliação.

Em contraponto, Hetter relata em seus estudos que conforme aumentava a concentração do óleo na formulação e se diminuía a porcentagem de fenol, o resultado de quimioesfoliação era mais eficaz (HETTER, 2000a).

Neste mesmo estudo, este pesquisador propôs a aplicação na região perioral, em um paciente, o fenol (50%) associado com o OC (2,1%), e no restante do rosto, apenas o fenol (50%). Como resultado obtido, na região perioral foi observada maior descamação e mais rápida cicatrização (11 dias para a restituição da pele), enquanto no restante do rosto não houve descamação significativa. Segundo Hetter

(2000), este resultado reforça que o responsável pela atividade quimioesfoliante é o OC e não o fenol (HETTER, 2000d).

A FH pode rejuvenescer uma pessoa aproximadamente 20 anos. As reações provocadas desde a aplicação até a pele restaurada e os sinais visíveis da mudança são características. Ocorre um processo de necrose na epiderme que é reconstruída dentro de 8 dias. Há também infiltrado inflamatório nos primeiros dias, ocorre um edema maciço e atinge a derme reticular. O processo de reconstrução da derme tanto histologicamente quanto fisiologicamente demora de 2 a 6 meses, há uma intensa síntese de fibroblastos, aparentemente tecido rico em colágeno e fibras elástica (elastose). Este efeito de intensa produção de colágeno e fibras elástica persiste por anos (VIGNERON, MUGGENTHALER, 2015; WAMBIER *et al.*, 2018).

No primeiro dia após a aplicação a pele fica acinzentada. Esta aparência é vista apenas na FH, há um edema generalizado. No segundo dia, o edema diminui consideravelmente, porém isso ocorre com o auxílio de corticoides, a cor acinzentada diminui consideravelmente. Após sete dias a pele está praticamente restaurada, pode haver eritema e pontos de sangramentos. Os efeitos do *peeling* podem variar de pessoa para pessoa e por causa da concentração do óleo de croton na fórmula. Na figura 08, mostra-se a recuperação após o procedimento (Hetter, 2000d).

Figura 08 – Efeito pós-operatório após aplicação da FH;



Fonte: Hetter (2000)d

Nota: 1 – primeiro dia pós-operatório; 2 – segundo dia após a aplicação; 3 – 7 dias após a aplicação; 4 – 22 dias após a aplicação.

2.4 EUPHORBIACEAE

Pertencente à classe das Angiospermas. A família Euphorbiaceae é muito rica em representantes, sendo que contém 290 gêneros distribuídos pelo mundo, principalmente em regiões tropicais (ALVES, 1998; HIROTA *et al.*, 2011).

Há algumas espécies dessa família que apresentam alta toxicidade, como por exemplo, *Euphorbia tirucalli*, cujo látex que pode causar conjuntivite ao entrar em contato com os olhos, ou ainda promover o crescimento de células tumorais (VAN DAMME, 2001; SHLAMOVITZ *et al.*, 2009; MWINE; VAN DAMME, 2011).

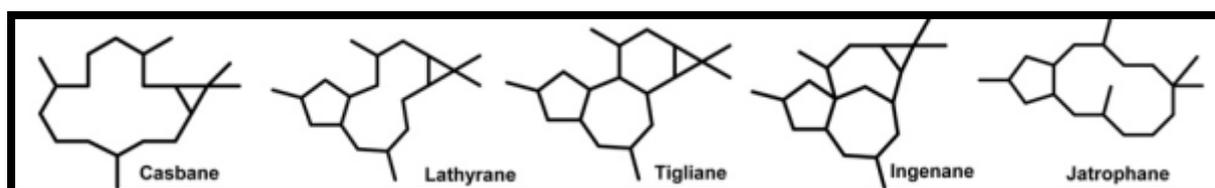
Outras espécies são usadas com finalidades comerciais, como a *Ricinus communis*, conhecida popularmente como mamona. O óleo desse vegetal possui diversas aplicabilidades e é muito importante economicamente, constituindo parte da formulação de tintas, participando na fabricação de nylon e como aditivo para reduzir a viscosidade em produtos alimentícios (SCHNEIDER, 2003).

Por outro lado, são muitas as espécies pertencentes a essa família que são conhecidas ou utilizadas com a finalidade medicinal (NASCIMENTO, 2013). O gênero *Croton*, que engloba aproximadamente 1300 espécies da família Euphorbiaceae. Essas espécies são utilizadas geralmente como analgésicas, anti-inflamatórias e para o tratamento do câncer. Há grande interesse econômico em espécies desse gênero, especialmente para as indústrias farmacêuticas pela abundância de metabólitos secundários interessantes (CRONQUIST, 1981; PAYO *et al.*, 2001; BASTO, 2014; ZHANG *et al.*, 2015).

Na espécie *Croton zambesicus* foram identificados monoterpenos (69,84%) presentes no óleo, que apresentaram boa atividade antimicrobiana, principalmente contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (YAGI *et al.*, 2016). Na espécie *Croton nepetaefolius* foram identificados diterpenoides e acetofenonas (SANTOS *et al.*, 2008).

Os principais constituintes químicos desta família são os diterpenos, cuja estrutura apresenta vinte átomos de carbonos. Os tipos de diterpenos apresentam núcleos denominados casbano, latirano, ingenanos, jatrofanos e tiglianos (Figura 09, pág. 32). Alguns diterpenos são conhecidos como ésteres de forbois, dos quais, alguns são descritos na literatura e apresentam atividade citotóxica contra tumores, anti-HIV, ativação da proteína quinase C (PKC) e outras ações (KIN *et al.*, 2014).

Figura 09 – Representação dos núcleos principais de alguns ésteres de forbois.

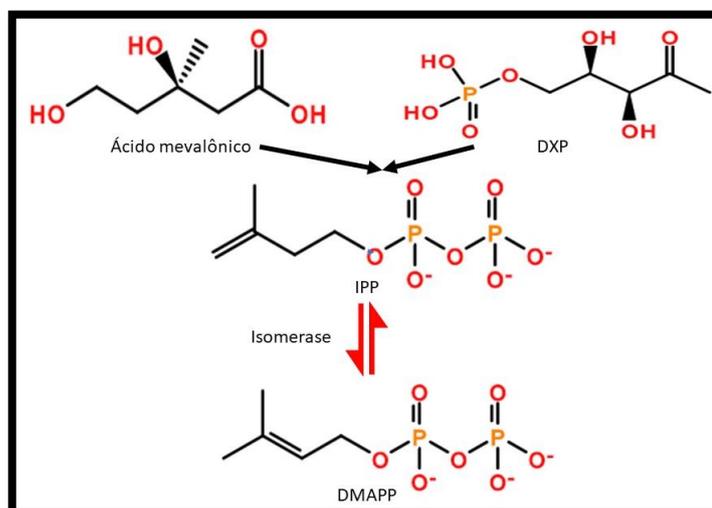


Fonte: King *et al.* (2014)

Os ésteres de forbois são substâncias lipossolúveis e são metabólitos tóxicos, que dependendo da dose e do tipo do núcleo central, podem ter atividade antitumoral ou pró-cancerígena, anti-inflamatória ou pró-inflamatória (HIROTA, TREVISAN, MIGUEL, 2010).

A síntese dos diterpenos nas plantas ocorre pela via do mevalonato ou da deoxixilulose fosfato (DXP) (Figura 10), formando uma molécula de isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero: dimetilalil difosfato (DMAPP).

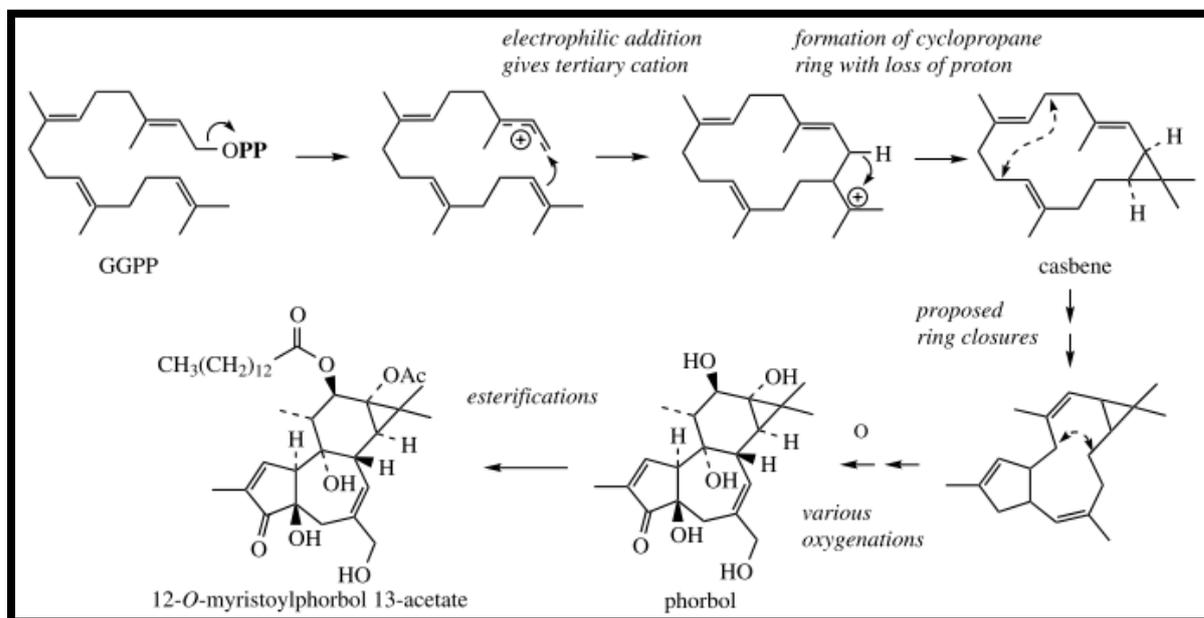
Figura 10 – Compostos envolvidos na síntese de diterpenos.



Fonte: A autora (2019).

Em uma série de reações químicas chega-se à molécula geranylgeranyl difosfato (GGPP) e a partir desta molécula são formados núcleos principais, pelos quais são classificados os tipos de diterpenos. Nestas reações é possível se obter diferentes compostos (Figura 11, pág 33). (DEWICK, 2002).

Figura 11: Formação dos forbois a partir do GGPP.



Fonte: Dewick (2002)

2.4.1 *Croton tiglium*

A espécie *Croton tiglium*, pertencente ao gênero *Croton*, conseqüentemente à família Euphorbiaceae, é comum nas regiões tropicais da Ásia. O seu fruto (*Crotonis fructus* – CF) é uma matéria-prima importante, utilizado no tratamento de distúrbios gastrointestinais e inflamatórios (TSAI; TSAI; CHANG, 2004; WANG *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014).

O principal constituinte do CF é o óleo, comumente denominado de croton, rico em ácido oleico, linoleico, eicosenoico. Outros compostos também têm sido identificados, como os diterpenos, que neste óleo podem ser abundantes e de estrutura variável, influenciando na atividade biológica relacionada a essa matriz vegetal. Este óleo já é extraído e comercializado por diferentes distribuidores que garantem sua originalidade, o método de obtenção desse óleo é por prensagem (KIM *et al.* 2014; ZHANG *et al.*, 2015).

O extrato metanólico da espécie *C. tiglium* foi testado frente às células tumorais pulmonares, avaliou-se a proliferação celular, apoptose e expressão de genes relacionados à apoptose. Verificou-se que o extrato inibiu a proliferação

celular, e os testes de indução de apoptose foi positivo, através da via Bax/Bcl-2 (LI *et al.*, 2016).

Segundo a literatura, Flashenträger (1930) identificou um conjunto de diterpenos denominados forbois no OC, indicando que sua atividade pró-inflamatória poderia estar associada a esses compostos.

Estima-se que a presença dos diterpenos no óleo é o que promove a inflamação no *peeling*, estimulando a renovação celular, visto que são substâncias pró-inflamatórias. Um estudo relatou o efeito do óleo na pele, que demonstrou a capacidade de promover uma visível epilação, edema inflamatório e hiperplasia epitelial grosseira (FREI *et al.*, 1964; VAN DUUREN, 1966).

Cai e colaboradores (2008) testaram a promoção da fibrose renal através do aumento da inflamação. Para tanto, utilizaram a substância 12-miristato 13-acetato de forbol (diterpeno), que ativou a ICAM-1 (expressa no endotélio dos vasos sanguíneos), auxiliando na adesão dos leucócitos ao endotélio e colaborando no processo pró-inflamatório.

Recentemente, alguns estudos com diferentes partes da espécie *C. tiglium* têm relatado estudos de atividades biológicas e isolamento de compostos. Lin e colaboradores (2016) relataram que o extrato etanólico obtido a partir das cascas e folhas secas de *C. tiglium* apresentou atividades contra fungos dermatófitos (Concentração Inibitória Mínima de 0,16 mg/mL para *Trichophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum*), sendo o ácido oleico e o ácido hexadecanoico identificados em abundância no extrato.

Wang e colaboradores (2015) descrevem o isolamento e identificação de ésteres de forbois a partir das partes aérea da planta, sendo que alguns não haviam sido descritos na literatura até aquele momento. Após o isolamento, os compostos foram utilizados em ensaios *in vitro* contra linhagens celulares tumorais e sadias frente a modelos anti-inflamatórios, e verificou-se alta toxicidade contra células tumorais e moderada contra as células sadias, e ação inibitória da COX-1 e COX-2.

Zhang e colaboradores (2013) também isolaram ésteres de forbois inéditos, e outros já descritos, e verificaram sua atividade citotóxica contra linhagem tumoral hepática, sendo que dois compostos apresentaram elevada toxicidade (IC₅₀ igual à 1,2 e 3,4 µM).

Wang e colaboradores (2015) identificaram ésteres de forbois das folhas e caules os quais foram avaliados quanto a atividade anti-inflamatória e citotóxica.

Este estudo demonstrou que alguns dos compostos isolados apresentaram atividade citotóxica significativa e anti-inflamatória.

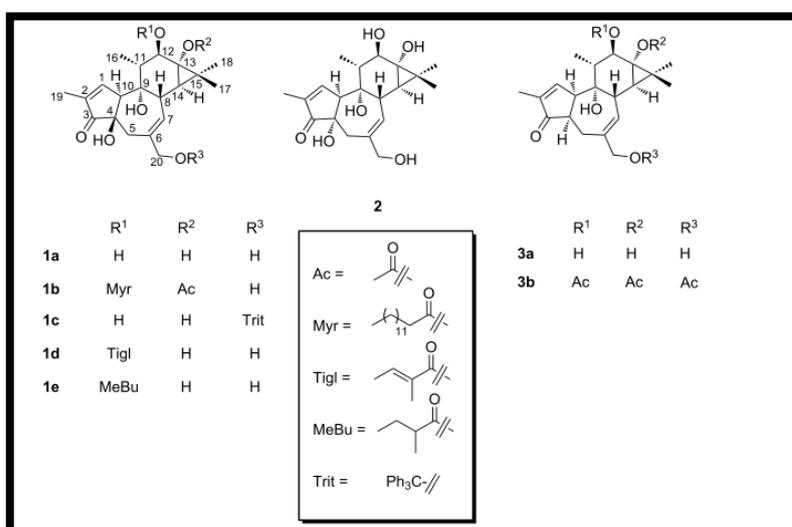
Foi testada a atividade de alguns ésteres de forbois em relação à ativação da proteína quinase C (PKC), que gera resposta inflamatória e desenvolvimento de tumores (GOEL *et al.*, 2007).

A extração dos ésteres de forbois a partir do OC é difícil e apresenta algumas etapas. Além disso é necessário o manuseio no óleo, que é tóxico e apresenta risco para quem está em contato direto com ele (PAGANI *et al.*, 2017)

Pagani (2017) desenvolveu um método para a extração e identificação de forbois no OC. Foi identificado que o óleo apresenta forbois do tipo A, apresentando um grupo acilo ligado ao grupo hidroxí secundário no C-12 e um grupamento acilo ligado ao 13-hidroxi. Apresenta também forbois do tipo B que possui um grupamento éster ligado ao 13-hidroxi e grupo acilo ligado ao 12-hidroxi (Figura 12). Nesta pesquisa foi determinando que o composto [phorbol (1a), 4 α -phorbol (2), 4-deoxy-4 α -phorbol (3a)], um diterpeno, é o majoritário no OC.

Há diversos ensaios antiinflamatórios que utilizam o OC como promotores de inflamação para testar um fármaco que combata este efeito (HOEPERS *et al.*, 2015). Segundo Pagani (2017) ao grau de inflamação causada por um forbol depende do seu nível de acilação.

Figura 12 – O diterpeno [phorbol (1a), 4 α -phorbol (2), 4-deoxy-4 α -phorbol (3a)] majoritário presente no OC e seus derivados.



Fonte: Pagani *et al.* (2017)

2.5 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)

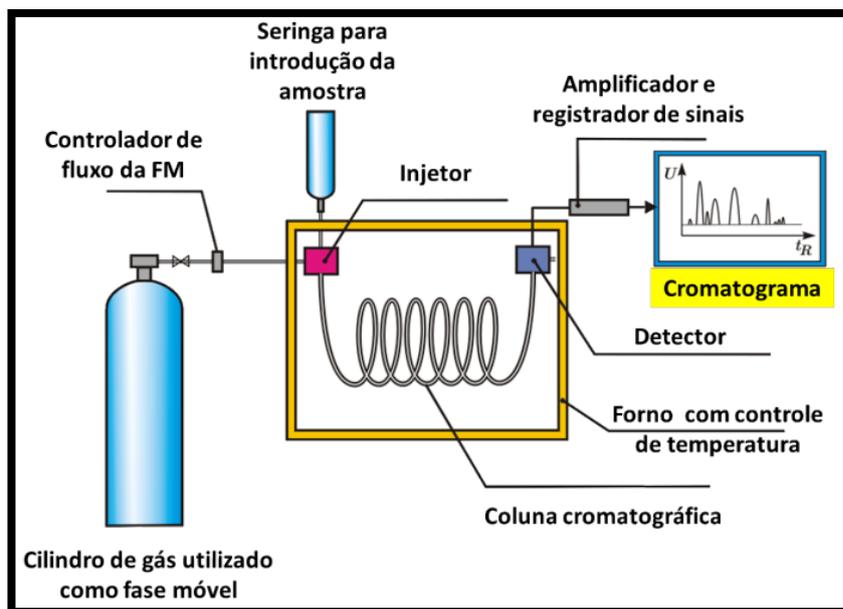
O método cromatográfico mais utilizado para a identificação de substâncias em matrizes oleosas é a Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM). O princípio do método está relacionado à interação da amostra (em estado gasoso) com a fase estacionária (FE – constituída por polisiloxano) e a fase móvel (FM – gasosa,). Substâncias que possuem um ponto de ebulição menor, passam pelo detector mais rapidamente, comparado com as substâncias que apresentam ponto de ebulição maior. Quanto maior a concentração do analito na amostra, maior a área do pico no cromatograma (MONTEIRO, 2008; SOUZA, 2008; VIEIRA, 2018).

A análise cromatográfica por CG tem crescido constantemente e cerca de 800 artigos sobre o assunto, ou relacionados a ele, são publicados por ano. Portanto, é uma técnica é muito difundida no meio da pesquisa. A identificação e quantificação de metabólitos secundários pode ser um trabalho árduo, visto que estes metabólitos estão em baixas concentrações nas matrizes complexas, como no caso de plantas, além de poder apresentar diversos interferentes que podem atrapalhar a análise (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; ZHANG; SUN; WANG, 2012; PREBIHALO *et al.*, 2017).

O sistema de um cromatógrafo a gás sempre terá a presença de um cilindro de gás para a fase móvel (FM), controlador de fluxo desta FM, injetor para a injeção da amostra, coluna cromatográfica, forno com controle de temperatura, detector e amplificador de sinais como está descrito na figura 13 (pág. 37) (COLLINS *et al.* 2006; PEDROSA, 2018).

Há diferentes gases (hélio, hidrogênio, argônio e nitrogênio) que podem ser utilizados como FM. Esta fase é importantíssima, pois é a responsável pelo arraste da amostra no sistema. Um dos requisitos básicos da escolha desse gás é ser inerte e de acordo com o tipo de detector presente no sistema, além de possuir alto grau de pureza. (SKOOG *et al.*, 2006).

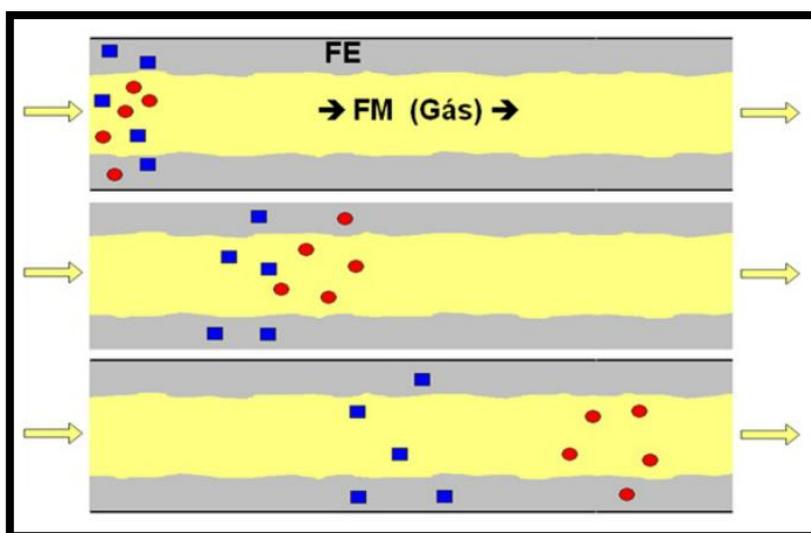
Figura 13 – Sistema do Cromatógrafo a gás.



Fonte: Pedrosa (2018)

A FE está presente dentro da coluna cromatográfica do sistema. Esta coluna é comumente constituída por polisiloxano. O revestimento da coluna deve ser inerte e não apresentar qualquer interação com a fase estacionária ou com a amostra, portanto os materiais utilizados para isso são aço inoxidável, vidro, alumínio, cobre, etc. Na figura 14 (pág. 38) está exemplificada a interação da amostra com a FM e FE. Há alguns fatores que devem ser considerados como diâmetro da coluna e comprimento, FE pela qual é constituída, sabe-se que quanto menor o diâmetro e maior o comprimento, maior o grau analítico do sistema (SKOOG, 2006; COLLINS, 2006; PEDROSA, 2018).

Figura 14 – Interação da amostra com a FM e FE.



Fonte: Pedrosa (2018)

Nota: Na imagem representa-se o que acontece dentro de uma coluna cromatográfica. No caso o sistema se refere à uma cromatografia gasosa. Representativamente, há duas substâncias (quadrados azuis e círculos vermelhos). Conforme a FM passa pelo sistema, carrega os círculos vermelhos, isto indica que essa substância tem maior afinidade pela FM, sairá do sistema e será detectada primeiro. Porém, os quadrados azuis possuem maior afinidade pela fase estacionária, que será detectado posteriormente.

2.6 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

A *International Chemometrics Society* (ICS) define a quimiometria como uma ciência que correlaciona dados obtidos através de um sistema ou método químico. Essa correlação é realizada por meio de programas que aplicam métodos matemáticos e estatísticos. Há dois tipos de análise: qualitativa e quantitativa. Na primeira aplicam-se métodos para reconhecimento de padrões e na segunda, a calibração multivariada (BRERETON, 2003; MAEDER *et al.*, 2006; GAD *et al.*, 2012)

Os dados para a avaliação quimiométrica de cromatogramas, sejam eles por CLAE ou CG-EM, são tempo de retenção e áreas de pico. Estes dados são dispostos em uma tabela, considerada a matriz, n são linhas e m são colunas. Cada cédula, portanto, terá um valor numérico (MASSART, 1997)

O procedimento se resume em desenho experimental, processamento dos dados, classificação e calibração. No desenho experimental, são escolhidos fatores importantes para serem analisados, etapa essencial principalmente quando as amostras são matrizes complexas. Processamento dos dados são utilizados quando há necessidade de reduzir variação, melhorando a qualidade dos resultados. Por

fim, são revisados e avaliados os resultados a fim de averiguar a necessidade de readequação dos métodos utilizados para esta análise (HANRAHAN; GOMEZ, 2010)

A quimiometria já foi aplicada muitas vezes para diferenciar espécies, por exemplo cromatogramas de CG-EM de diferentes espécies do gênero *Eucalyptus* sp., estudo realizado por Dunlop e colaboradores (1995).

Outro estudo reportou a comparação de compostos ativos em uma formulação de um óleo de uma erva chinesa. Esses foram analisados por CG-EM e por PCA (análise do componente principal), uma das técnicas exploratórias da quimiometria, a fim de correlacionar com a bioatividade (SU *et al.*, 2008)

3 Objetivos

3.1 GERAL

Este trabalho propõe avaliar a atividade dermatológica do óleo de Croton comercial e incorporado na fórmula de Hetter, a camada inferior e superior da fórmula e realizar a caracterização química dos constituintes dessas amostras.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação das formulações sobre a pele de modelo suíno de forma macroscópica e microscópica;
- Avaliar a presença de colágeno, células e substância fundamental nos tempos de 1, 7 e 21 dias após aplicação das amostras na pele de modelo suíno;
- Diferenciar colágeno tipo I e tipo III nos tempos de 1 e 21 dias por meio da coloração de Herovici nas amostras teciduais;
- Caracterização química do óleo de croton e das camadas superior e inferior da fórmula de Hetter;
- Verificar a estabilidade do OC;
- Realizar uma análise quimiométrica dos dados químicos obtidos.

4 Materiais e métodos

4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

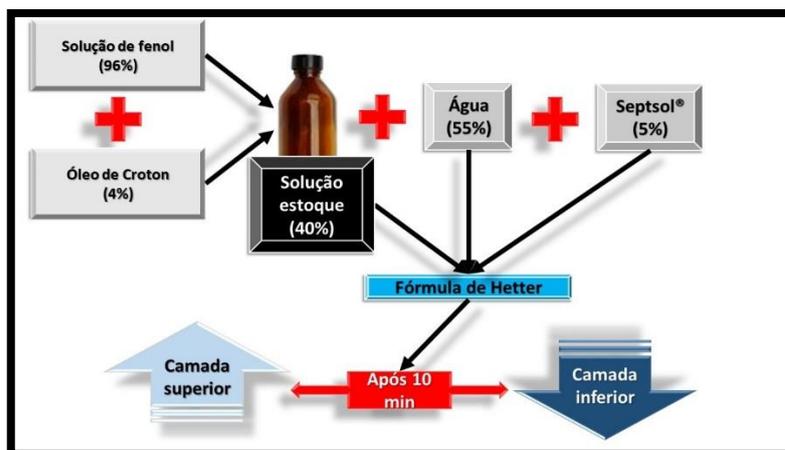
As amostras utilizadas para os experimentos foram preparadas a partir de informações contidas em Hetter (2000 d), exceto o controle negativo e o óleo *in natura*. Antecedendo a manipulação da formulação proposta por Hetter, foi preparada uma solução estoque contendo 1,6% de OC e 98,4% de solução de fenol a 88%. Posteriormente, foi preparada uma nova fórmula contendo 40% da solução estoque, 55% de água e 5% de Septisol® (detergente, possui ação bacteriostática, porém na formulação não auxilia no efeito de peeling, é um tensoativo), esta última é a fórmula de Hetter *very heavy* (Controle positivo - C+). Para a obtenção da camada superior e inferior, foi deixado, em descanso, a fórmula de Hetter por 10 minutos. Logo após este tempo, ocorreu a formação de duas fases, então, foi retirada, com o auxílio de uma seringa, a camada superior (CS) e transferida para outro frasco, a camada inferior (CI) foi mantida no mesmo frasco. O controle negativo (C-) consistiu em apenas 95% de água e 5% de Septisol®, foi preparada também uma fórmula sem o fenol (SF), contendo 1,6% de OC, 93,4% de água e 5% de Septisol®. Para a caracterização química foi utilizada a fórmula de Hetter, a CS, CI e o óleo *in natura*. Na tabela 02 estão apresentadas as proporções para os diferentes grupos e na figura 15 (pág. 42) é apresentado o esquema de preparo da fórmula de Hetter.

Tabela 02 – Amostras utilizadas na pesquisa e suas fórmulas.

| Código da amostra | Amostra | Formulação | (%) |
|-------------------|--|-----------------|------|
| C- | Controle negativo | Água | 5 |
| | | Septisol® | 5 |
| C+ | Controle positivo Formulação de Hetter <i>very heavy</i> (a partir da solução estoque recém-preparada) | Água | 55 |
| | | Septisol® | 5 |
| | | Solução estoque | 40 |
| CS | Camada superior da solução final de Hetter <i>very heavy</i> | Água | 55 |
| | | Septisol® | 5 |
| | | Solução estoque | 40 |
| CI | Camada inferior da solução final de Hetter <i>very heavy</i> | Água | 55 |
| | | Septisol® | 5 |
| | | Solução estoque | 40 |
| SF | Fórmula sem fenol | Água | 93,4 |
| | | Septisol® | 5 |
| | | OC | 1,6 |

Fonte: A autora (2019).

Figura 15 – Esquema do preparo da Fórmula de Hetter (2000) e camadas superior e inferior.



Fonte: A autora (2019).

4.2 AVALIAÇÃO *IN VIVO*

Para a avaliação da atividade dermatológica das amostras foi selecionado o modelo suíno, pelo fato de a estrutura da pele desses animais ser mais próxima à do ser humano. Foi enviado ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) o requerimento, que foi aprovado sob o número de processo 034/2017. Foi realizado o experimento com 4 animais brancos, sendo dois machos e duas fêmeas, de 4-5 meses de idade com o peso de 30-35 Kg. O procedimento foi baseado no trabalho de Larson e colaboradores (2009), com modificações. Primeiramente, os animais foram tranquilizados com Acepromazina 0,4 mg/Kg, Cetamina 14 mg/Kg e Xilasina 0,2 mg/Kg aplicados via intramuscular. Eles foram mantidos inconscientes com Propofol 5 mg/Kg por via intravenosa, foram anestesiados por inalação com Isoflurano em uma concentração alveolar mínima de 1,2 a 1,7%.

Foi realizada a raspagem dos pelos e demarcações com caneta permanente das áreas para a aplicação das amostras, na região dorsal e lateral esquerda, sendo 3 linhas de cada lado para os dias 1, 7 e 21. As áreas para as aplicações apresentavam dimensões de 2x2 cm com espaçamento de 2 cm entre cada área (Figura 16 – pág. 43). As amostras foram aplicadas com *swab* e de forma aleatória e randomizada. Ressalta-se que as amostras para este experimento foram preparadas 1 h antes do mesmo e antes de cada aplicação, as amostras eram homogeneizadas com o *swab* da aplicação. Os animais foram mantidos reclusos, com alimentação e água em horários programados, evitando contaminação da região por parasitas. Após 1, 7 e 21 dias, foram retiradas amostras do tecido (biópsias) com *punch* de 4

mm de diâmetro. As biópsias foram armazenadas em frascos contendo 5 ml de solução de formol a 10% (tamponado). Após 72 h, o conteúdo do frasco foi lavado em água corrente por 5 min e trocado por etanol 70% até o processamento das amostras no histotécnico (LEICA® TP 1620). No histotécnico, as amostras passaram por um processo de desidratação utilizando diferentes concentrações de álcoois. Em seguida, foram diafanizadas com xilol. Após as amostras terem passado pelo histotécnico, elas foram incluídas em parafina histológica fundida a 60°C para a obtenção dos blocos histológicos. As amostras em parafina foram cortadas com o micrótomo (LEICA RM 2125RT), apresentando 5 µm de espessura. Após isso, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Herovici.

Figura 16 – Modelo animal, demarcações dos *spots* de forma randomizada e aleatória.



Fonte: A autora (2019).

4.2.1 Coloração – HE e Herovici

Para a coloração HE o procedimento está descrito na tabela 03 (pág. 44). Esta coloração foi utilizada para determinar através do programa ImageJ® 1.51j8, a espessura do epitélio (fotomicrografias com ampliação de 200x) e quantidade de células, hemácias, substância fundamental, vasos sanguíneos e colágeno presentes (fotomicrografias com ampliação de 400x).

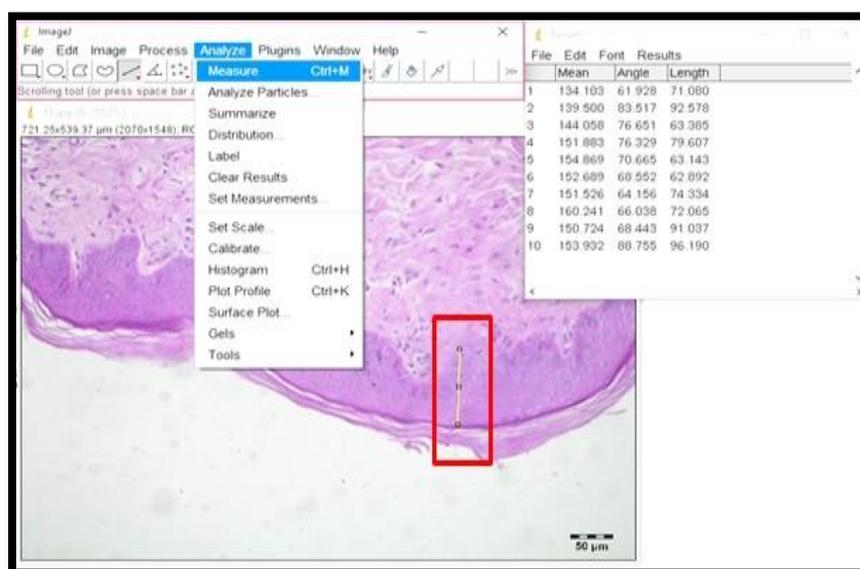
Foi obtido um $n=80$ para cada solução aplicada em um dia de biópsia, que se refere a 4 animais, dois lados diferentes de cada animal, totalizando 8 peças cirúrgicas. Para cada amostra, foram confeccionadas 2 lâminas e para cada corte histológico, foram tiradas 5 fotomicrografias de regiões distintas a fim de se obter um n amostral considerável.

Tabela 03 – Procedimento da coloração de Hematoxilina e Eosina.

| N | Reagente | Tempo |
|----|---------------------------|--------------------|
| 1 | Xilol | 10 min |
| 2 | Álcool Absoluto | Colocar-tirar |
| 3 | Álcool 90% | Colocar-tirar |
| 4 | Álcool 70% | Colocar-tirar |
| 5 | Álcool 50% | Colocar-tirar |
| 6 | Água de torneira | Colocar-tirar 2x |
| 7 | Água destilada | Colocar-tirar 2x |
| 8 | Hematoxilina de Mayer | 12,5 min |
| 9 | Lavagem com água corrente | 15 min |
| 10 | Álcool 80% | Colocar-tirar 2x |
| 11 | Eosina | 2,5 min |
| 12 | Álcool absoluto | Colocar e tirar 3x |
| 13 | Xilol | Colocar e tirar 2x |

Fonte: A autora (2019).

A espessura do epitélio (Figura 17) foi mensurada traçando-se uma reta calibrada (conversão de pixels em μm), calibração realizada com instrumentos do programa. Esta reta tinha início na camada granulosa da epiderme, porção posterior ao estrato córneo e finalizava na camada basal, divisão entre o epitélio e a derme. Eram realizadas 10 medições na mesma imagem e os dados eram transferidos para uma tabela no Excel[®].

Figura 17 – Determinação da espessura do epitélio no programa Image J[®].

Fonte: A autora (2019).

Para a coloração de Herovici, os reagentes foram preparados no dia da utilização, pois a Hematoxilina utilizada pode sofrer degradação. O procedimento

utilizado está descrito na tabela 04 e foi fornecido pelo fabricante dos reagentes. Esta coloração foi utilizada para diferenciar colágeno tipo I (antigo) e colágeno tipo III (novo) dos *spots* que receberam as amostras C-, C+ e CI (tabela 02, pág. 41), através da contagem no programa ImageJ® 1.51j8.

Tabela 04 – Procedimento da coloração HEROVICI

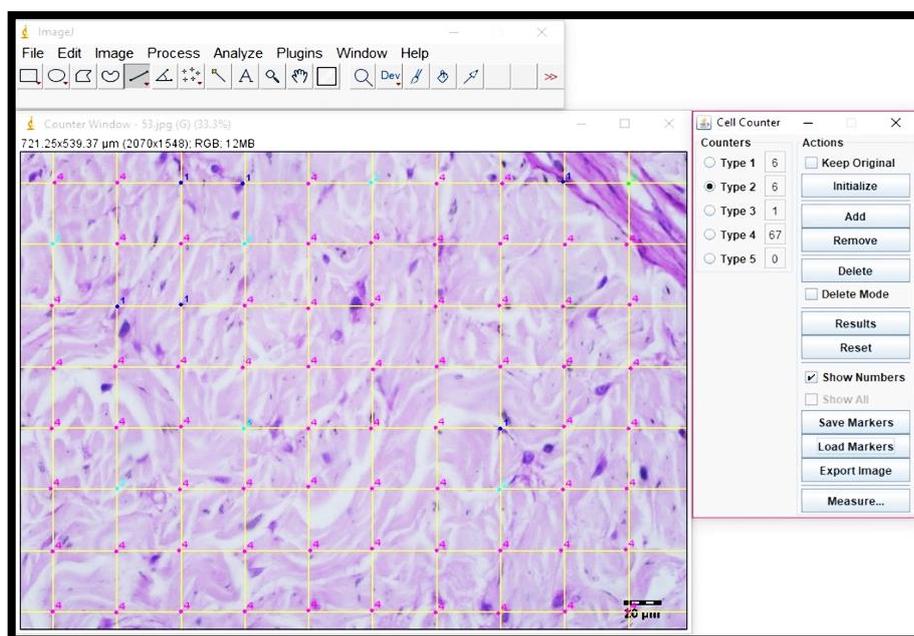
| N | Reagente | Tempo (min) |
|----------|-------------------------|--------------------|
| 1 | Xilol | 5 |
| 2 | Xilol | 5 |
| 3 | Álcool absoluto | 1 |
| 4 | Álcool absoluto | 1 |
| 5 | Álcool absoluto | 1 |
| 6 | Lavagem com água | 1 |
| 7 | Hematoxilina de Weigert | 5 |
| 8 | Solução Herovici | 2 |
| 9 | Ácido acético (1%) | 2 |
| 10 | Álcool absoluto | 1 |
| 11 | Álcool absoluto | 1 |
| 12 | Álcool absoluto | 1 |
| 13 | Xilol | 1 |
| 14 | Xilol | 1 |
| 15 | Xilol | 1 |

Fonte: A autora (2019).

A contagem nas colorações Herovici e HE foi realizada utilizando o método representado na figura 18 (pág. 46). Foi colocado sobre a imagem capturada (ampliação de 400x) uma malha quadriculada, com 80 vértices. Em cada vértice, foi identificado o elemento presente, que pelo *software* era contabilizado, os resultados foram transferidos para uma planilha no Excel®. As médias, desvios e análise estatística foram realizadas pelo programa GraphPad Prism®.

Todas as análises histomorfométricas foram realizadas por dois analistas cegos, que foram treinados na questão de identificação dos elementos, após uma análise comparativa das médias e desvios dos analistas em 10 fotos, a análise foi continuada.

Figura 18 – Contagem dos elementos histológicos pelo programa Image J®.



Fonte: A autora (2019).

Nota: HE: Type1 – células; Type2 – substância fundamental; Type3 – vasos sanguíneos; Type4 – colágeno; Type5 – hemácias; Herovici: Type1 – colágeno tipo III; Type2 – colágeno tipo I; Type3 – células; Type4 – substância fundamental; Type5 – hemácias. Obs: fotomicrografia de um corte histológico corado com HE.

4.2.2 Estatística

A estatística dos resultados foi realizada pelo programa GraphPad Prism® 5.0 utilizando o método ANOVA (Analysis of Variance) de duas vias. Os fatores foram o tempo (coleta em diferentes dias) e o tratamento utilizado, com intervalo de confiança de 95%. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram $p < 0,05$.

4.3 AVALIAÇÃO QUÍMICA

4.3.1 CG-EM

As análises de CG-EM foram realizadas na Universidade do Mississippi (EUA) pelo equipamento de CG (Agilent® 7890^a) e EM (Agilent® 5975C). As amostras analisadas estão descritas na tabela 05. As amostras utilizadas para esta análise foram as mesmas utilizadas no experimento *in vivo*.

Tabela 05 – Amostras analisadas por CG-EM.

| Amostras | Finalidade da análise |
|-----------------|---|
| OC comercial | Caracterização química, estabilidade química do óleo dentro de 3 meses. |
| Solução estoque | Caracterização química |
| CS | Caracterização química |
| CI | Caracterização química |

Fonte: A autora (2019).

Primeiramente, foi realizado um processo de extração: 40 µL das amostras foram colocadas em *ependorfs*. Logo em seguida foi adicionado 1 mL de solução de KOH/MeOH (0,4 M) e 100 µl do padrão interno (tridecanoato de metila, 12,26 mg/mL em n-hexano). Esta solução foi colocada em banho ultrassônico a 60°C por 30 min. Então, essas soluções passaram por um processo de extração com 1 mL de n-hexano por 30 min, sob agitação em vórtex. Essa etapa foi repetida por 2 vezes. As camadas que continham ácidos graxos esterificados foram transferidas para frascos, a fim de serem injetadas no equipamento de CG. A análise foi realizada em duplicata. Após a padronização da corrida cromatográfica, foi determinada a condição ideal que está descrita no quadro 01.

Quadro 01 – Parâmetros da condição cromatográfica da análise das amostras.

| Parâmetros CG | | Parâmetros EM | |
|---------------|--|-----------------------|--------------|
| Coluna | Agilent J&W DB-23 (50%-cianopropil)-metilpolisiloxane), (30m x 0.25mm, 0.25µm) | Voltagem de Ionização | 70 eV |
| Temperatura | Início: 50°C por 1 min | Scan <i>m/z</i> | 40 – 500 amu |
| | Aumentar 20°C/min até atingir 175°C | | |
| | Aumentar 4°C/min até atingir 220°C | | |
| Injeção | Volume: 0,5 µL | Banco de dados | NIST e Wiley |
| Taxa de fluxo | 1,2 mL/min | | |

Fonte: A autora (2019).

4.3.2 Análise quimiométrica

A análise quimiométrica do óleo de croton dentro de 3 meses foi realizado injetando-se a amostra no CG-MS em dias alternados. Por dia, eram realizadas duplicatas em dois turnos (manhã e tarde). Portanto, era obtido 4 cromatogramas por dia, totalizando 74 cromatogramas. Nos cromatogramas foram selecionados os 20 picos característicos para uma análise. Esta análise foi realizada pelo programa

Statistica[®] 8.0 utilizando o método de PCA. Os dados foram processados e posteriormente interpretados.

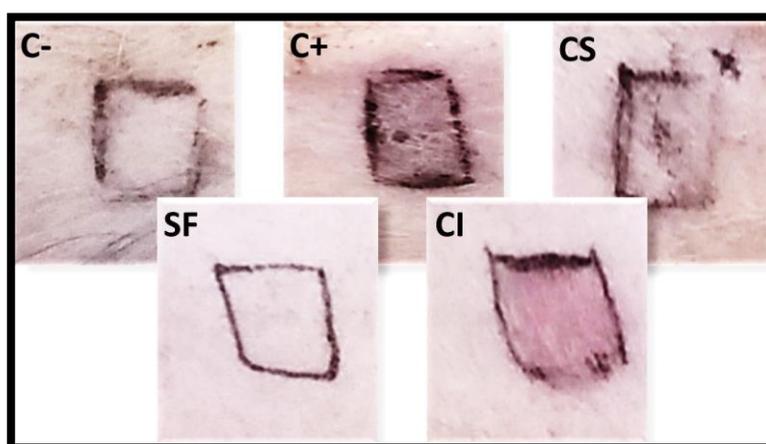
5 Resultados

5.1 ANÁLISE *IN VIVO*

A avaliação *in vivo* utilizando modelos suínos permite ter uma visão dos possíveis efeitos das amostras em seres humanos. Ainda que a técnica de *peeling* com a FH seja utilizada desde 2000 de forma baseada na experiência clínica, não se pode ter certeza dos efeitos farmacológicos e toxicológicos deste procedimento. Assim, o estudo dessa fórmula utilizando a metodologia de estudo *in vivo* usando modelos suínos permitiu avaliar parâmetros importantes, e assim verificar os possíveis efeitos do *peeling* ao aplicar essa formulação sobre a pele.

Ao aplicar a FH sobre a pele dos suínos, se observou uma irritação visível e instantânea na pele (Figura 19). Nos *spots* que receberam os tratamentos com a FH (C+) e a CI da fórmula verifica-se rapidamente um efeito como a vermelhidão, característica que não foi observada nas outras aplicadas. Como o suíno tem um processo de restauração do tecido mais rápido que o humano, no 7º e 21º dia após a aplicação das amostras, não foram constatadas diferenças macroscópicas entre as amostras (TURNER, PEZZONE, BADYLAK, 2015)

Figura 19 – Imagens macroscópicas da pele logo após a aplicação dos tratamentos.



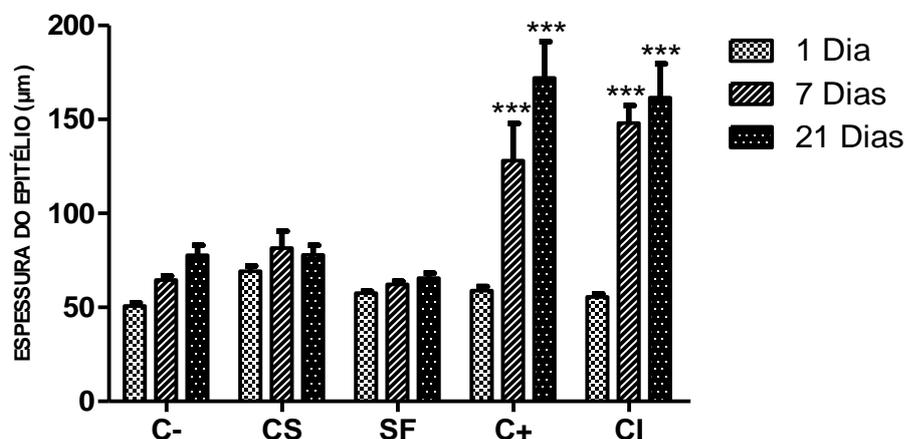
Fonte: A autora (2019).

Nota: C- (controle negativo); C+ (controle positivo); CS (camada superior); SF (sem fenol); CI (camada inferior).

A avaliação da espessura do epitélio foi realizada com ampliação de 200x. Foi utilizada inicialmente a coloração de HE para determinação dessa característica. Nessa análise. Foi possível observar um aumento da espessura do epitélio nos dias

7 e 21 para as amostras dos grupos C+ e CI (Figura 20), com diferença estatística em relação às outras amostras.

Figura 20 – Espessura do epitélio entre a amostras analisadas.

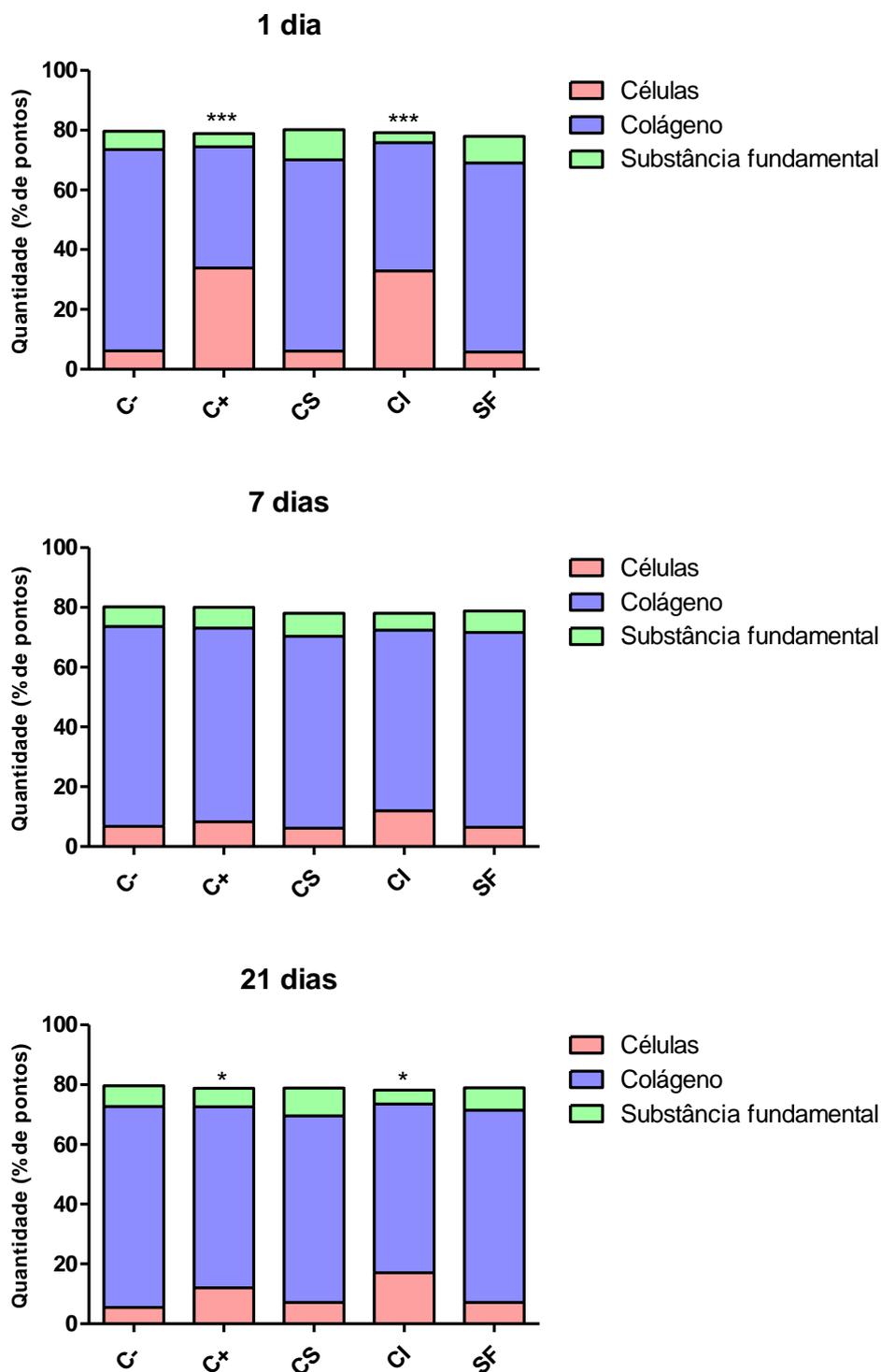


Fonte: A autora (2019).

Nota: (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$, teste ANOVA de duas vias, fatores variantes: tratamento e tempo, quando comparados aos demais grupos (C-, CS e SF).

Na ampliação de 400x, foi realizada a contagem dos outros componentes pela coloração HE. Na figura 21 (pág. 51) é possível observar que há um aumento na quantidade de células nas amostras dos grupos do C+ e CI no 1º dia após a aplicação dessas formulações. O aumento de células nesses grupos é justificado pelo processo inflamatório que ocorre no local da aplicação, onde os possíveis ativos da formulação estão agindo, reforçando a característica inicialmente observada macroscopicamente.

Figura 21 – Gráficos referente à análise dos elementos presentes no tecido analisado (ampliação de 400x).

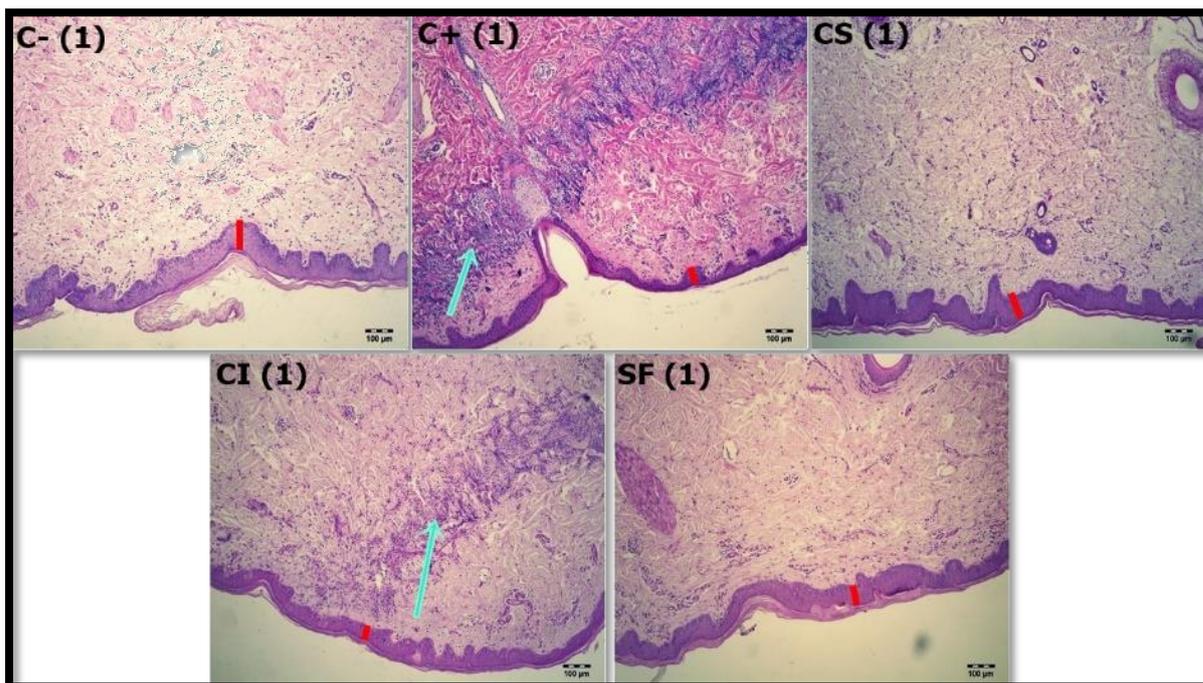


Fonte: A autora (2019).

Nota: (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$, teste ANOVA de duas vias, fatores variantes: tratamento e tempo, quando comparados os grupos.

Por meio da figura 22, foi possível correlacionar os resultados dos gráficos com as imagens. Os grupos C-, CS e SF não apresentaram diferenças morfológicas entre eles (estrutura do tecido). Referente ao dia 1, os grupos C+ e CI apresentaram uma faixa de inflamação na derme, com a presença de muitas células, possivelmente em resposta à inflamação.

Figura 22 – Fotos das amostras do 1 dia após a aplicação (ampliação de 100x).

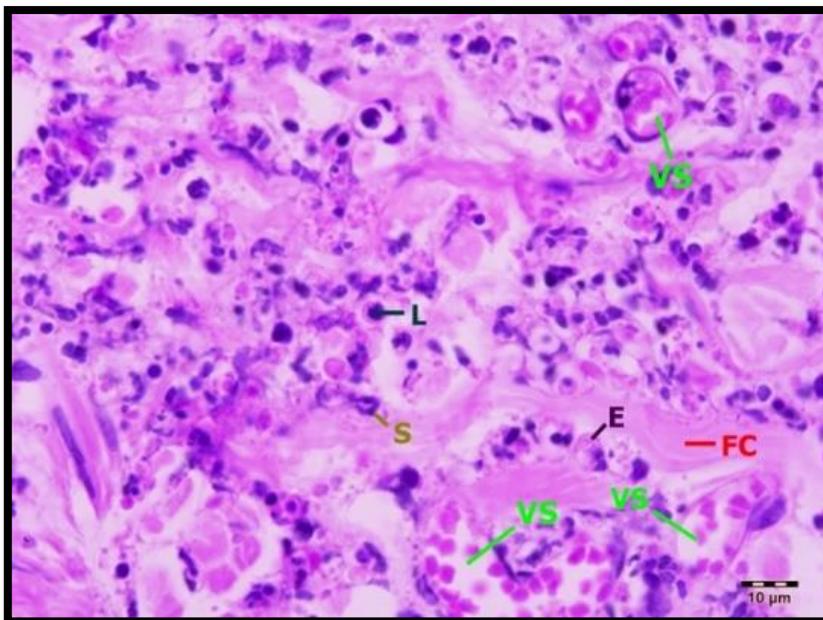


Fonte: A autora (2019).

Nota: Traços vermelhos indicam a espessura do epitélio, foram analisados 10 pontos para cada imagem nesse quesito, flecha azul indica o infiltrado inflamatório que está presente no C+ (1) e CI (1).

Com a ampliação de 1000x da região do infiltrado inflamatório é possível observar células inflamatórias, justificando a evidência encontrada em relação ao aumento de células (Figura 23 – pág. 53).

Figura 23 – Amostra C+ ampliada 1000x, região do infiltrado inflamatório (HE) – biópsia após 1 dia do tratamento.

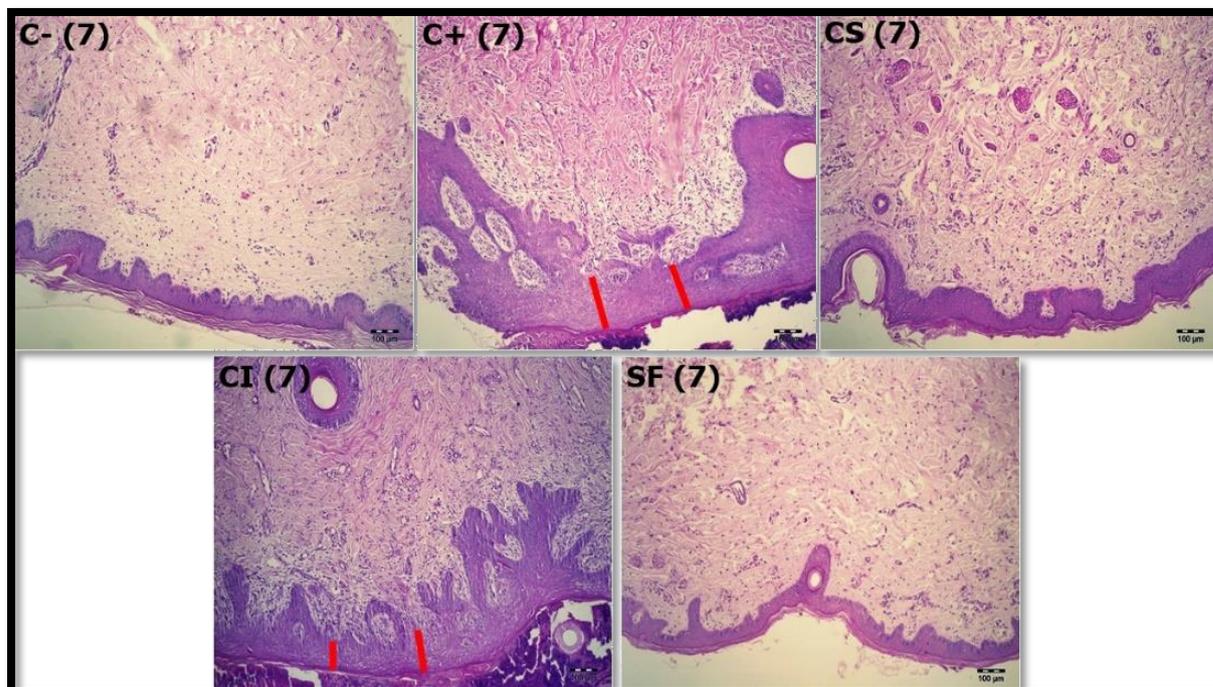


Fonte: A autora (2019).

Nota: células inflamatórias identificadas no tecido: L – leucócito; S – segmentado; E – eosinófilo; FC – fibras de colágeno; VS – vasos sanguíneos congestos.

No dia 7 após a aplicação, as amostras não apresentaram diferença estatística entre os componentes estudados. Porém houve um leve aumento em relação à quantidade de células, podendo indicar que o processo inflamatório agudo retrocedeu. Neste dia, houve um aumento na espessura do epitélio, como relatado anteriormente. Estes resultados são possíveis de serem observados na figura 21 (pág. 50) e comparados com a figura 24 (pág. 54).

Figura 24 – Fotos das amostras, após 7 dias da aplicação (ampliação de 100x).

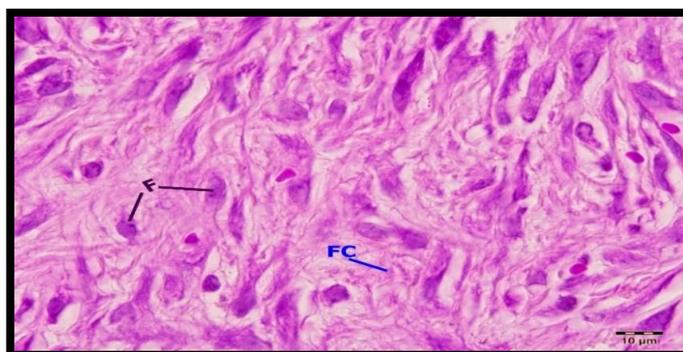


Fonte: A autora (2019).

Nota: Traços vermelhos indicam a espessura do epitélio, foram analisados 10 pontos para cada imagem nesse quesito, aumento observado na CI e C+.

No 21º dia, a contagem da quantidade de células voltou a mostrar-se elevada, com diferença significativa para os grupos C+ e CI. Aparentemente, no gráfico (Figura 21 – pág. 51) a presença de células é maior na CI. Porém estas células não são inflamatórias, pode-se sugerir que houve um aumento da quantidade de fibroblastos pois ampliando 1000x é possível verificar estas células pela análise morfológica (Figura 25).

Figura 25 – Amostra C+ (ampliada 1000x) após 21 dias do tratamento (HE, 1000x).

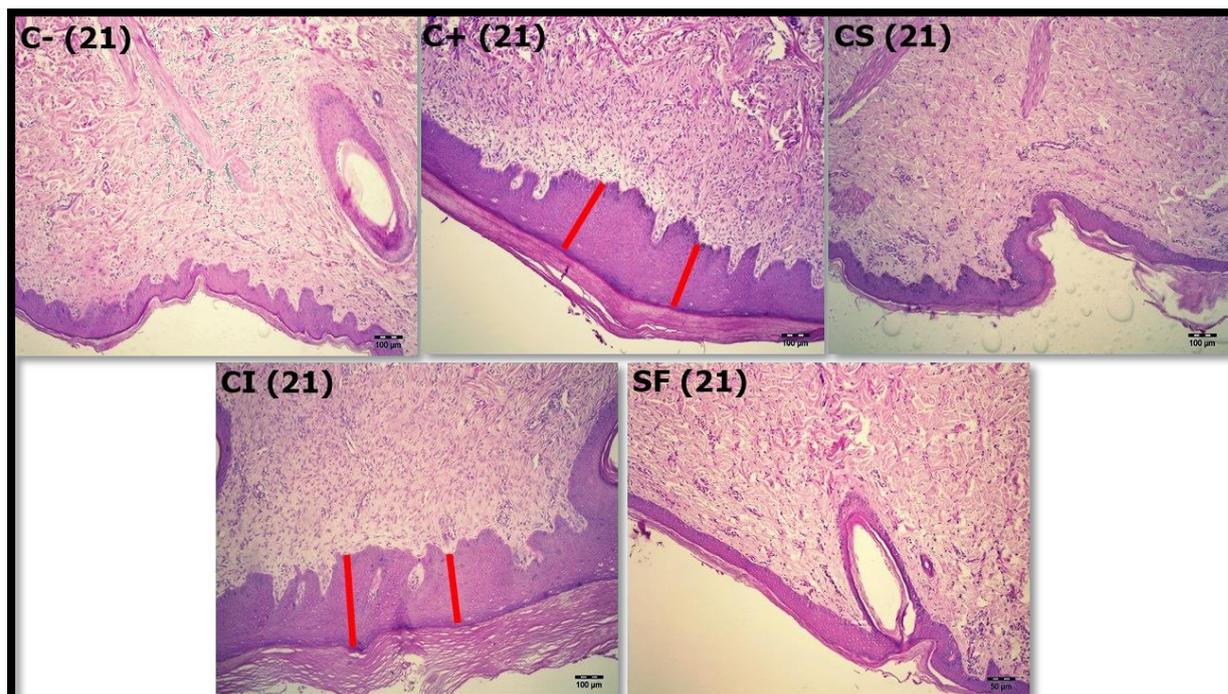


Fonte: A autora (2019).

Nota: F – fibroblasto; FC – fibras de colágeno.

Na figura 26 é possível analisar o tecido ampliado 100x (HE). Na análise descritiva a respeito desta figura, foi possível observar que no C+ e na CI, houve um espessamento do epitélio. Porém os limites desse epitélio estão mais definidos. Havia muitas células, as fibras de colágeno estavam mais condensadas e aparentemente mais finas

Figura 26 – Fotos das amostras após 21 dias da aplicação (ampliação de 100x).



Fonte: A autora (2019).

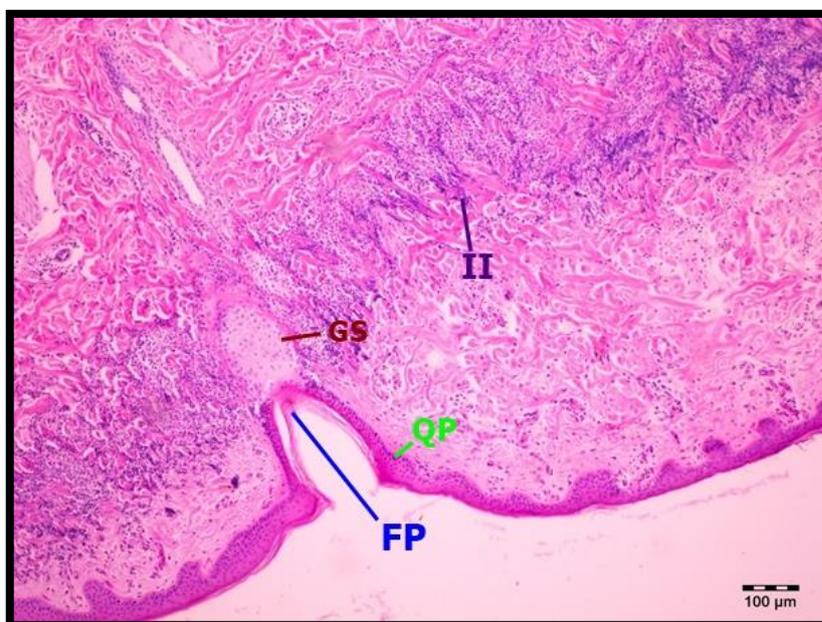
Nota: Traços vermelhos indicam a espessura do epitélio, foram analisados 10 pontos para cada imagem nesse quesito, aumento observado na CI e C+.

A redução da quantidade de colágeno nas amostras (C+ e CI) nos dias 1 e 21 refere-se à proporção analisada, visto que foram contados 80 pontos na malha aplicada sobre as imagens. Portanto esta redução é consequência do aumento da quantidade de células devido à inflamação existente no tecido no 1º dia e no dia 21 ao aumento da quantidade de fibroblastos. Em relação à substância fundamental, não foi obtida diferença significativa entre os tratamentos aplicados e os dias de biópsias.

Em relação à diferença estatística entre o tempo, é possível observar uma diferença estatística maior no 1º dia comparado com o dia 7 e 21 para células e colágeno, com $p < 0,001$. O dia 21 apresenta $p < 0,05$ comparado com o dia 7 para os mesmos elementos.

Algumas observações nas amostras do C+ podem ser visualizadas microscopicamente comparando-se entre 24 horas e 7 dias após o tratamento: em 24 horas, houve um destacamento da camada córnea sem reação na epiderme. Houve presença de queratinócitos picnóticos, o folículo piloso está razoavelmente preservado, houve acrossiríngeo (glândulas sudoríparas comprometidas). Na derme superior, ocorreu edema com congestão superior e na derme inferior, houve a presença de células polimorfonucleares predominantemente, indicativo de dano agudo (Figura 27).

Figura 27 – Fotomicrografia ampliada 100x, 24h após a aplicação da FH.

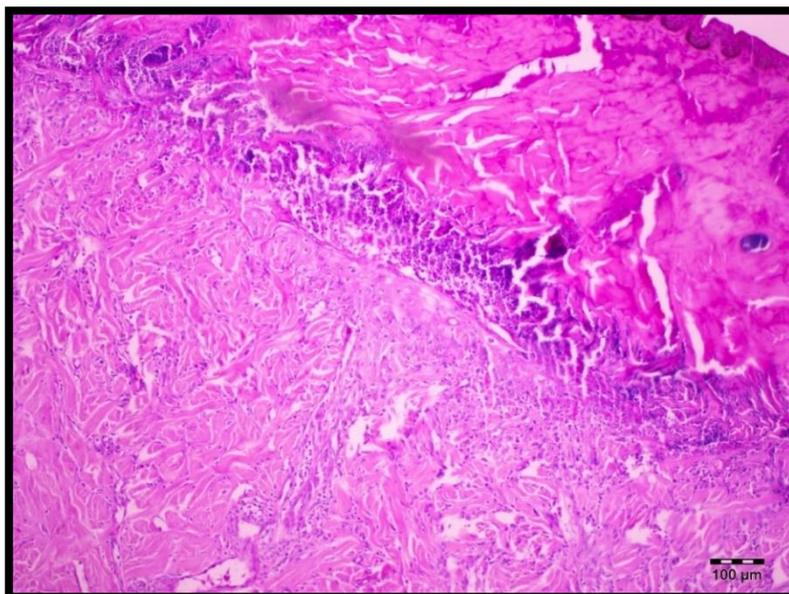


Fonte: A autora (2019).

Nota: FP – folículo piloso; QP – queratinócito picnótico; GS – glândula sebácea; II – infiltrado inflamatório.

Após 7 dias, foi possível observar que a derme superior estava necrosada e na derme inferior, houve um processo de reparo, com edema e proliferação vascular (tecido de granulação), houve polimorfonucleares também, possivelmente seriam mastócitos que participam assiduamente em processos de reparo tecidual (Figura 28 – pág. 57).

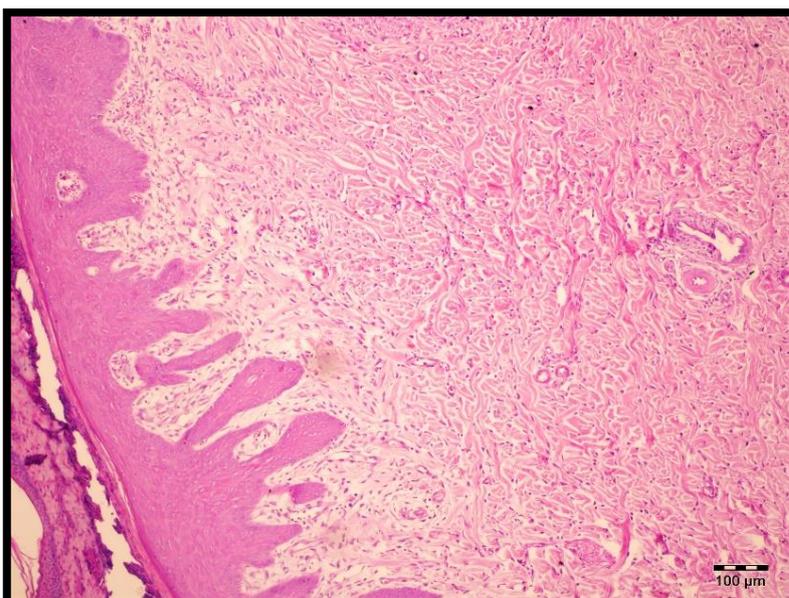
Figura 28 – Fotomicrografia ampliada 100x, 7 dias após o tratamento com a FH (coloração HE)



Fonte: A autora (2019).

Ao analisar a figura 29, foi possível observar um destacamento dermoepidérmico da amostra, possivelmente a parte necrosada está se desprendendo na nova estrutura que está sendo formada.

Figura 29 – Fotomicrografia ampliada 100x, 7 dias após o tratamento com a FH (coloração HE)

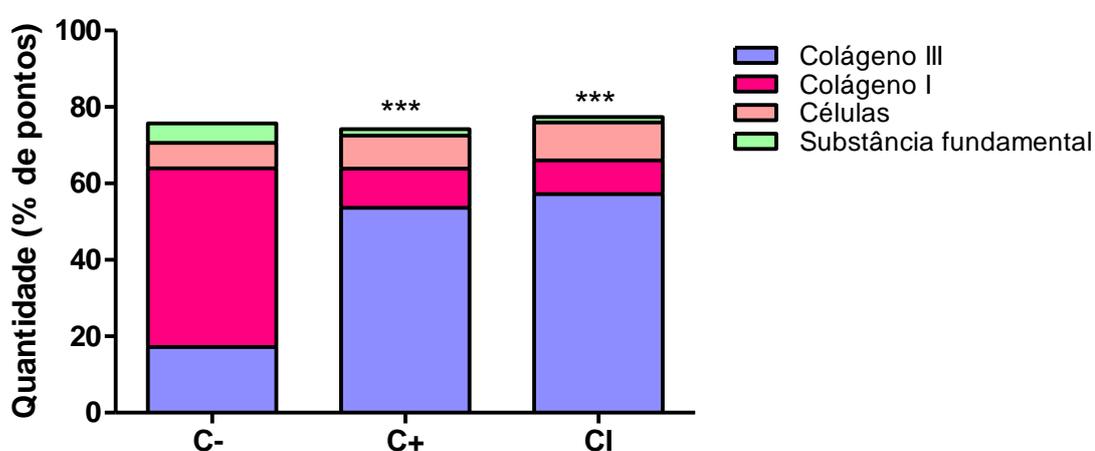


Fonte: A autora (2019).

Nota: Observa-se que há um desprendimento dermoepidérmico na foto.

Através da coloração de HEROVICI foi possível diferenciar o colágeno tipo I (maduro) do colágeno tipo III (jovem), através desta análise que foi realizada com as amostras após 21 dias do tratamento (para os grupos C-, C+ e CI), foi possível perceber que houve diferença estatística entre os resultados encontrados (Figura 30). No grupo do C+ e na CI houve um aumento significativo do colágeno tipo III. Esses dados são apresentados na figura 31 (pág. 58) e reforça que a atividade entre a CI e o C+ são equivalentes.

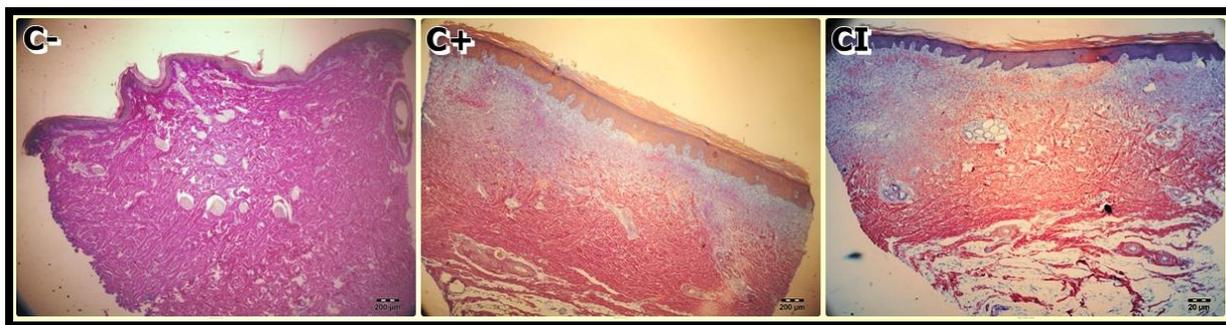
Figura 30 – Resultado das análises realizadas por HEROVICI das amostras de 21 dias.



Nota: (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$, teste ANOVA de duas vias, fatores variantes: tratamento e tempo.

Em relação à diferença estatística é possível afirmar que 21 dias após a aplicação, se observa um aumento significativo na produção de colágeno tipo III. Ao observar o resultado presente na figura 31 (pág. 59), é possível observar estes dados, a cor azul intensa na imagem do C+ e CI indica presença abundante de colágeno jovem (tipo III) justificando os resultados apresentados no gráfico, comparando com o C- que é composto praticamente por colágeno tipo I.

Figura 31 – Microfotografia das lâminas coradas com Herovici (ampliada 400x).

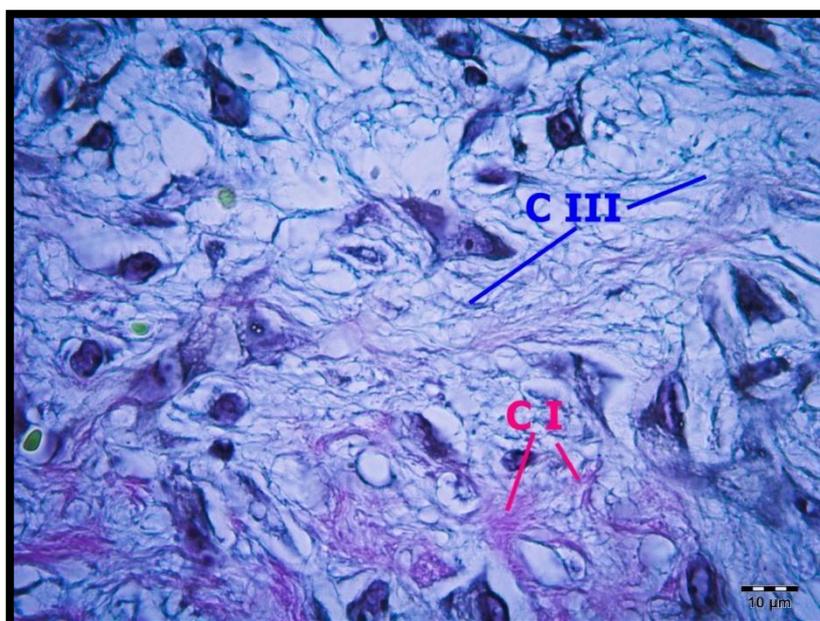


Fonte: A autora (2019).

Nota: Amostra tratada com o C-, C+ e CI biópsia realizada após 21 dias do tratamento. Cor azul indica colágeno tipo III, cor rosa indica colágeno tipo I.

Em relação a quantidade de células no tecido, observou-se um aumento devido à presença de inflamação para as amostras tratadas com a fórmula de Hetter, reforçando os dados observados na coloração de HE. Na figura 32, foi possível observar no aumento de 1000x que as fibras de colágeno tipo III são mais finas e estão em maior quantidade que o colágeno tipo I, além da presença de fibroblastos.

Figura 32 – Imagem da pele tratada com o C+ (Herovici, ampliação de 1000x).



Fonte: A autora (2019).

Nota: F – fibroblastos; FC III – fibras de colágeno tipo III; FC I – fibras de colágeno tipo I.

]

5.2 ANÁLISE QUÍMICA

Na avaliação da composição química do óleo comercial por CG-EM foi possível identificar 19 ácidos graxos majoritários que estão descritos na tabela 06 e figura 33 (pág. 61).

O fabricante do óleo utiliza a identificação destes ácidos graxos para a determinação da qualidade e comprovação de que o óleo extraído pertence à espécie *C. tiglium*. Portanto esta identificação foi de suma importância para a continuação dos testes para esta pesquisa, visto que comprovou que o óleo utilizado pertence à espécie, evitando algum resultado errôneo.

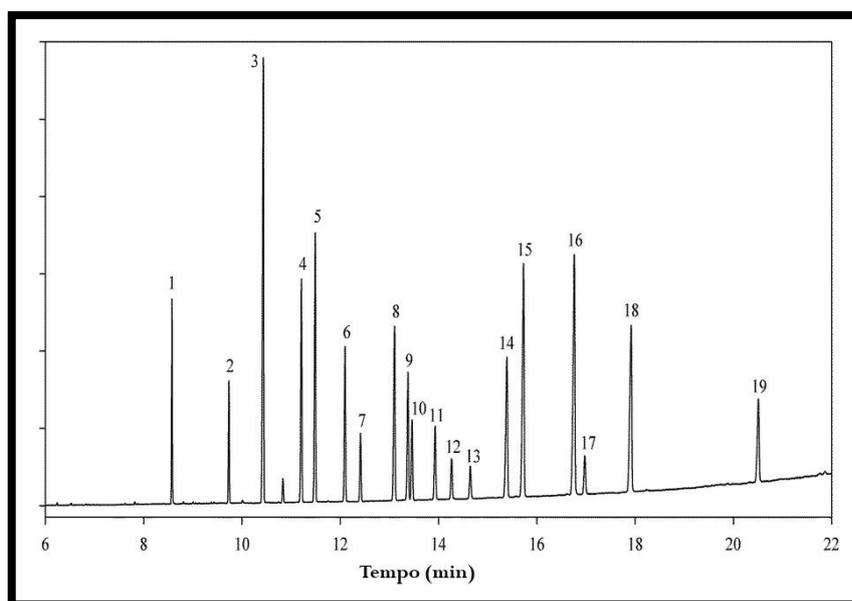
Tabela 06 – Ácidos graxos identificados pela técnica de CG-EM no óleo de croton comercial.

| N | Ácidos graxos metil éster | Tempo de Retenção (min) | Abreviatura | Massa molecular |
|----|--|-------------------------|------------------------------------|-----------------|
| 1 | Ácido láurico, metil éster | 8.575 | C12:0 | 214 |
| 2 | Ácido mirístico, metil éster | 9.734 | C14:0 | 242 |
| 3 | Ácido pentaecanoico, metil éster | 10.433 | C15:0 | 256 |
| 4 | Ácido palmítico, metil éster | 11.209 | C16:0 | 270 |
| 5 | Ácido palmítoleico, metil éster | 11.490 | C16:1/cis-9 | 268 |
| 6 | Ácido heptadecanoico, metil éster | 12.097 | C17:0 | 284 |
| 7 | Ácido cis-10-heptacecenoico, metil éster | 12.412 | C17:1/cis-10 | 268 |
| 8 | Ácido esteárico, metil éster | 13.104 | C18:0 | 298 |
| 9 | Ácido oleico, metil éster | 13.379 | C18:1/cis-9 | 296 |
| 10 | Ácido cis-vaccenico, metil éster | 13.461 | C18:1/cis-11 | 296 |
| 11 | Ácido linoleico, metil éster | 13.930 | C18:2/cis-9, cis-12 | 294 |
| 12 | Metil γ -linolenato | 14.267 | C18:3/cis-6, cis-9, cis-12 | 292 |
| 13 | Metil linolenato | 14.649 | C18:3/cis-9, cis-12, cis-15 | 292 |
| 14 | Ácido araquídico, metil éster | 15.329 | C20:0 | 326 |
| 15 | Ácido cis-11-eicosenoico, metil éster | 15.732 | C20:1/cis-11 | 324 |
| 16 | Ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico, metil éster | 16.764 | C20:3/cis-8, cis-11, cis-14 | 320 |
| 17 | Ácido araquidônico, metil éster | 16.978 | C20:4/cis-5, cis-8, cis-11, cis-14 | 318 |
| 18 | Ácido behenico, metil éster | 17.922 | C22:0 | 354 |
| 19 | Ácido tetracosanoico, metil éster | 20.511 | C24:0 | 382 |

Fonte: A autora (2019).

Os resultados obtidos foram comparados com padrões adquiridos e com o banco de dados presentes no banco de dados NIST/Wiley.

Figura 33 – Cromatograma do óleo de croton comercial obtido pela técnica de CG-EM.



Fonte: A autora (2019).

As análises cromatográficas das amostras do óleo no decorrer de 3 meses foram realizadas. Na sequência, foi aplicada a avaliação quimiométrica para auxiliar na decisão de quais informações químicas contidas nesses cromatogramas eram relevantes na interpretação dos resultados, essa análise foi realizada construindo-se uma matriz com os dados de todos os cromatogramas obtidos, sendo que as variáveis foram os pontos referentes aos 19 picos cromatográficos obtidos na análise realizada

Para garantir o sucesso da análise, foi realizado um tratamento dos dados originais, fazendo-se um ajuste do conjunto de dados. Para não dar diferentes pesos a compostos que apresentavam diferentes magnitudes, impedindo que alguns elementos viessem ser mais representativos na análise, realizou-se o pré-processamento dos dados empregando-se o auto escalonamento, em que cada variável (cada coluna da matriz de dados) é centrado na média e então dividido pelo seu desvio padrão.

A análise dos componentes principais permitiu avaliar o comportamento dos dados e visualizar a estrutura desses. As duas componentes principais foram capazes de extrair aproximadamente 92% dos dados analisados, conforme pode ser

observado na tabela 07. A primeira componente foi responsável por 80% das informações e a segunda por 12% das mesmas.

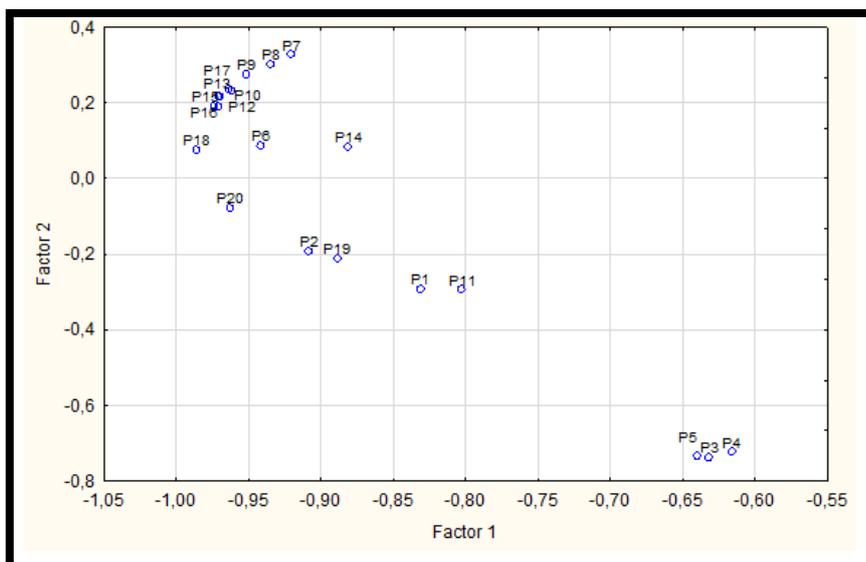
Tabela 07 – Autovalores e percentual da variância explicada de cada componente.

| Autovalores da matriz de correlação e estatística relacionada (picos normalizados máximos) | | | | |
|---|--------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Ativar apenas variáveis | | | | |
| Componente | Autovalores | Variância total (%) | Autovalor cumulativo | Variância cumulativa (%) |
| 1 | 15,98050 | 79,90248 | 15,98050 | 79,9025 |
| 2 | 2,55513 | 12,77567 | 18,53563 | 92,6781 |
| 3 | 0,70810 | 3,54051 | 19,24373 | 96,2187 |
| 4 | 0,28512 | 1,42558 | 19,52885 | 97,6442 |
| 5 | 0,25831 | 1,29154 | 19,78715 | 98,9358 |
| 6 | 0,10802 | 0,54010 | 19,89517 | 99,4759 |
| 7 | 0,03522 | 0,17611 | 19,93040 | 99,6520 |
| 8 | 0,01870 | 0,09349 | 19,94909 | 99,7455 |
| 9 | 0,01699 | 0,08493 | 19,96608 | 99,8304 |
| 10 | 0,00748 | 0,03742 | 19,97356 | 99,8678 |
| 11 | 0,00641 | 0,03205 | 19,97998 | 99,8999 |
| 12 | 0,00404 | 0,02021 | 19,98402 | 99,9201 |
| 13 | 0,00362 | 0,01810 | 19,98764 | 99,9382 |
| 14 | 0,00316 | 0,01582 | 19,99080 | 99,9540 |
| 15 | 0,00229 | 0,01145 | 19,99309 | 99,9655 |
| 16 | 0,00189 | 0,00945 | 19,99498 | 99,9749 |
| 17 | 0,00162 | 0,00809 | 19,99660 | 99,9830 |
| 18 | 0,00136 | 0,00681 | 19,99796 | 99,9898 |
| 19 | 0,00121 | 0,00607 | 19,99918 | 99,9959 |
| 20 | 0,00082 | 0,00412 | 20,00000 | 100,0000 |

Fonte: A autora (2019).

Pode-se ainda destacar, a partir da análise dos dados matemáticos, que os picos cromatográficos 3,4 e 5 são relevantes para a classificação determinada (Figura 34 – pág. 63).

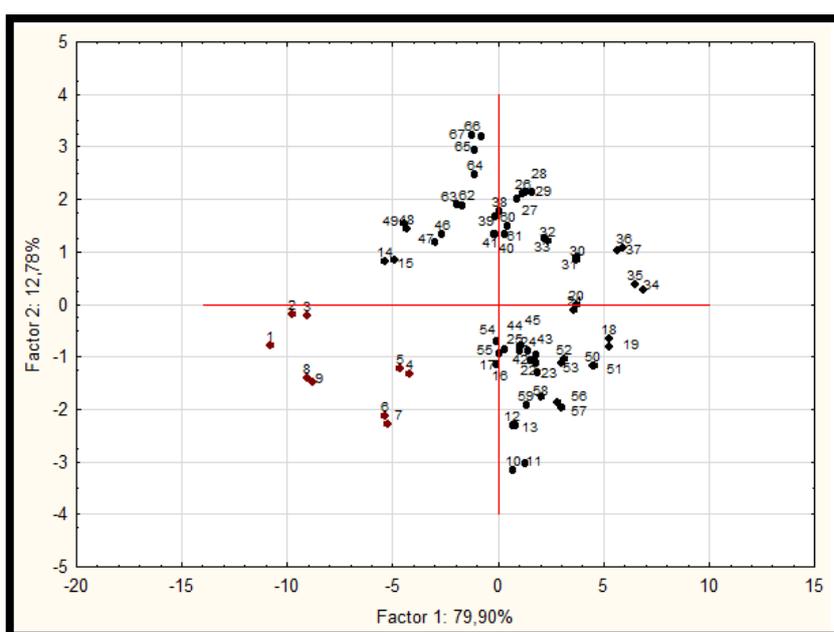
Figura 34 – Análise da correlação entre os picos com as componentes principais.



Fonte: A autora (2019).

Na figura 35 é possível observar o resultado obtido através da projeção das componentes principais um (PC1) e dois (PC2). Essa projeção permitiu verificar que após 2 semanas de abertura do frasco de óleo de croton, já foi possível se observar a redução da concentração dos principais componentes químicos presentes na matriz, indicando uma possível degradação dos compostos presentes no óleo.

Figura 35 – Variação representadas entre as amostras.



Fonte: A autora (2019).

Em relação à avaliação química da CS e CI da fórmula de Hetter, primeiramente foi analisado cada composto identificado nos cromatogramas obtidos e que foram sugeridos pelo banco de dados do software. Posteriormente, foram selecionados os picos relevantes, excluindo os picos que indicavam compostos sintéticos que não fazem parte do OC. Por fim, foi realizada uma pesquisa bibliográfica relacionando a presença destes compostos à espécie *C. tiglium*, gênero *Croton* e família Euphorbiaceae (Tabela 08).

Tabela 08 – Substâncias consideradas relevantes e presentes na CS e CI da fórmula de Hetter, comparando com a literatura.

| Amostra | Pico | TR (MIN) | Composto | |
|---------|------|----------|-----------------------|-----------------|
| CS | 3 | 19,572 | 3 –noneno-2-one | |
| | *4 | 5,41 | Eucaliptol | |
| | *6 | 6,304 | Linalool | |
| | *7 | 8,422 | Terpineol | |
| | 8 | 10,575 | Cinamaldeído, (E)- | |
| | *9 | 12,527 | Eugenol | |
| | **10 | 14,533 | Cariofilleno | |
| | 11 | 14,986 | Cumarina | |
| | CI | **14 | 17,609 | Alfa.-Farneceno |
| | | **19 | 19,874 | Alfa.-Farneceno |
| | | 20 | 20,368 | L-Fenchona |
| 21 | | 29,362 | Ácido n-Hexadecanoico | |
| 25 | | 33,579 | Ácido Oleico | |
| 26 | | 34,003 | Ácido Octadecanoico | |
| 33 | | 44,414 | Ácido Palmitoleico | |

Fonte: A autora (2019).

Nota: (*) monoterpeno; (**) sesquiterpeno

6 Discussão

Ao analisar os resultados da análise histológica, é importante salientar que o aumento da espessura da epiderme pode ser classificada como uma hiperplasia pseudo-epiteliomatosa, que desenvolveu-se frente à resposta inflamatória causada pela aplicação das fórmulas avaliadas (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

Esta hiperplasia pseudo-epiteliomatosa é um processo reacional do organismo possivelmente em decorrência, no caso do *peeling*, da substância agressiva que levou à eliminação transepidérmica de células inflamatórias, elementos dérmicos indesejáveis (materiais necróticos – evidência na figura 28, 29). O processo de eliminação ocasionaria a expansão do epitélio hiperplásico, que circundaria o material lesivo, a medida que os queratinócitos amadurecessem, o material seria expelido (AKILOV *et al.*, 2007; LYNCH, 2004; RAMDIAL *et al.*, 2000).

Quando acontece um evento que induz a inflamação, o primeiro acontecimento observado no tecido inflamado é o processo de vasodilatação. Aumentando-se assim o fluxo sanguíneo da região e em seguida ocorre a leucodiapedese, fenômeno conhecido pela migração das células de defesa dos vasos sanguíneos para o tecido lesionado. Também é observada a migração de células polimorfonucleares e posteriormente de monocitárias para a região inflamada. Os resultados obtidos indicaram esse acontecimento, pois apresentou infiltrado inflamatório no 1º dia após o tratamento (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

Gonser e colaboradores (2017) fizeram um ensaio no qual se aplicou o *peeling* de fenol/óleo de croton sobre um retalho cutâneo, retirado após cirurgia de lipoescultura facial, após 24 h houve intensa necrose epidérmica, inclusive necrose na região papilar e derme reticular, edema e infiltrado inflamatório grave, além da destruição dos anexos cutâneos.

A presença de fibroblastos no 21º dia após o tratamento sugere que a fórmula de Hetter possa promover uma neocolagenase, ou seja, produção maior de colágeno novo favorecendo a elasticidade e rejuvenescimento do tecido sobre o qual foi aplicada a formulação que contém o OC.

Uma pele saudável normalmente apresenta 80-85% de colágeno tipo I e 10-15% de colágeno tipo III. A redução destes tipos de colágeno é característica da pele envelhecida. No processo de restauração de um tecido lesionado, a cicatrização resulta em um infiltrado inflamatório que gerou colágeno tipo III, um

colágeno recém-formado que é mais frágil (EL-DOMYATI *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2016).

Este efeito de intensa produção de colágeno jovem é o diferencial neste *peeling*, Hetter (2000d) em seus estudos supõe isto devido a pele rejuvenescida formada, e este efeito pode perdurar por anos segundo os dados clínicos apresentados por dermatologistas (WAMBIER, *et al.*, 2018).

Segundo Wambier e Freitas (2016) o *peeling* apenas com o fenol atinge exclusivamente a primeira porção da derme, sendo considerado um *peeling* médio, além da cicatrização não se igualar ao *peeling* com a FH. Neste caso, há uma produção maior de colágeno e a inflamação atinge camadas mais profundas da derme, podendo chegar até a hipoderme. Porém, estes resultados são de análises realizadas pelos dermatologistas em seus próprios pacientes, apenas aplicando as fórmulas sobre a pele, permanecendo muitos resultados sem explicação.

Na análise realizada por Butler e colaboradores (2001), na qual camundongos foram tratados com diferentes tipos de *peeling*, os tratamentos com a fórmula de BG e tricloroacético apresentaram um espessamento da epiderme maior que os outros tratamentos.

Um detalhe interessante é a integridade da epiderme em 24 h. Enquanto há um processo inflamatório nas camadas mais profundas, em outros métodos, por exemplo, *peeling* com laser ou dermoabrasão que remove a epiderme e deixa o tecido exposto à situações de risco, como infecções. No *peeling* aplicado neste trabalho a epiderme serve como uma oclusão no local enquanto o tecido se reorganiza novamente, portanto o *peeling* com a FH proporciona certa segurança neste quesito, só a partir do momento que a derme se torna escara, a epiderme começa a necrosar, fato observado na figura 29 (pág. 58) que apresenta o desprendimento dermoepidérmico após 7 dias (SETYADI *et al.*, 2008; METELITSA; ALSTER, 2010).

Kadunc (1998) relata que o tratamento do ácido pirúvico associado ao OC apresentou aspectos histológicos e clínicos mais agressivos. Porém o foco de sua pesquisa foi o ácido pirúvico e não levou em consideração o efeito pró-inflamatório do OC. Conclui-se que o OC aumenta o poder de penetração e proporciona uma distribuição do ácido uniformemente pelo tecido, mas as evidências da revisão sobre o OC não indicam apenas isso.

O OC há muitos anos, vem sendo utilizado inclusive em procedimentos de

pesquisa como promotor de inflamação. Estudiosos utilizam este método para testar substâncias com potencial anti-inflamatório. Segundo Sari e colaboradores (2016), foi realizado um ensaio para testar novas substâncias anti-inflamatórias. Para isso foi induzida uma inflamação com uma solução de óleo de croton (2,5%) em acetona.

Nishiki e colaboradores (1988), induziram hemorroida em ratos com o OC para testar um novo medicamento para o tratamento desta patologia. Nos sintomas inflamatórios e histológicos induzidos pelo OC houve edema, infiltrado de fibrina, células inflamatórias, vasodilatação, alto e médio grau de necrose no epitélio. A solução que foi aplicada para promover este grau de inflamação foi 6% de OC em éter etílico.

Em um estudo semelhante, foi realizada a comparação entre as atividades pró-inflamatórias da cantaridina (substância extraída do besouro) e do óleo de croton e percebeu-se que o óleo produzia uma resposta inflamatória mais intensa e mais rápida que a cantaridina (SWINGLE *et al.* 1981). O óleo de croton causa formação de vesículas, necrose e queimadura severa inclusive em pequenas concentrações (LANDAU, 2005)

No estudo de Larson e colaboradores (2009), foram avaliadas diferentes concentrações de fenol e óleo de croton, além do fenol isoladamente. Destacou-se que sinais macroscópicos das lesões aumentava conforme aumentava a concentração do OC, evidenciando o *peeling* profundo, e que o *peeling* apenas com o fenol provocava um eritema e edema momentâneo, seguido de rápida cicatrização. Assim como neste trabalho, o fenol não é o único responsável pelo efeito do *peeling*, há a possibilidade da interação sinérgica entre os dois componentes (OC e o fenol) que proporcionam o efeito do *peeling* profundo, portanto, há a necessidade de estudos mais profundos sobre isto.

Há trabalhos que relatam que o fenol realmente possui atividade e trabalhos que mostram a ação pró-inflamatória do OC que foram citados no texto, visto que Hetter (2000d), Wambier e Freitas (2016), Larson e colaboradores (2009) afirmaram que a fórmula de Hetter promove resultados mais eficazes, devido ao OC, que a fórmula apenas com o fenol. Porém neste estudo a fórmula SF não apresentou resultados promissores, provavelmente por não haver algum promotor de permeação do OC, pois nos trabalhos onde se aplicam este óleo para estudos inflamatórios, há reagentes orgânicos como éter etílico e acetona.

Em resumo, é bem característico o processo de restauração da pele após o *peeling*. Na primeira fase, considerada aguda, que pode durar até 72 h, é possível visualizar lesões dérmicas e epidérmicas além do infiltrado inflamatório. Após este processo, há a fase de reepitelização, na qual o aumento da espessura do epitélio é característico. Logo em seguida, por volta de 21 dias após o tratamento, podendo durar por até 6 meses dependendo, da profundidade do *peeling*, as fibras de colágeno estão se remodelando (KADUNC, 1998)

Porém neste trabalho, não foi possível identificar ou justificar o emprego do OC na fórmula, portanto, é necessário pesquisas mais profundas que continuem os ensaios. Acredita-se que é necessário algum componente que solubilize ou promova a permeação cutânea deste óleo na pele para verificar seu efeito pró-inflamatório.

Em relação aos estudos químicos, a partir dos resultados obtidos sobre a análise quimiométrica dos cromatogramas obtidos por 3 meses, pode-se afirmar que não é aconselhável reutilizar o óleo decorridos muitos meses após aberto o frasco. Pode começar um processo de degradação de seus compostos, e com isso, comprometer a efetividade do óleo. Óleos podem ser oxidados facilmente, principalmente quando há algumas situações que favorecem este processo, como a alta temperatura e presença de oxigênio por exemplo (CHEN *et al.*, 2017).

O ácido palmítico, indicado como o pico 4, foi um dos picos que mais variou nas análises de quimiometria. Este degrada facilmente pelo processo de oxidação, principalmente em relação à variação de temperatura como relatado no estudo de Chen e colaboradores (2017).

A capacidade de oxidação aumenta exponencialmente quando há na molécula um grupo metileno alílico. Assim, a capacidade de oxidação do o ácido oleico e do ácido linoleico (dois ácidos que podem estar presentes no OC). Portanto, cadeias poli-insaturadas tem maior propensão a sofrer oxidação (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Os compostos sugeridos pela NIST e Wiley estão descritos na tabela 8 (pág. 70) e ao realizar uma comparação e verificação na literatura foi possível observar que muitos deles estão presentes na família Euphorbiaceae e inclusive no gênero *Croton* (Tabela 9, pág. 77). Através desta análise, foi possível observar que os compostos bioativos podem estar presentes na CI, visto que há uma maior concentração deles nesta fase e estes compostos e pertencem à classes dos monoterpenos e sesquiterpenos. Os ésteres de forbois, que são diterpenos, foram

encontrados na espécie estudada e são apontados como os responsáveis pelos efeitos inflamatórios na pele, porém sua concentração pode ser mínima no óleo, o que justifica a complexidade em encontra-los e identificá-los (DEWICK, 2002; PAGANI *et al.*, 2017).

A literatura descreve alguns sesquiterpenos como citotóxicos, dependendo de suas concentrações, os testes realizados foram principalmente para células do sangue e cancerígenas, porém é de conhecimento que diversos medicamentos anticancerígenos não possuem seletividade, causando danos em diferentes células normais do organismo. Portanto este efeito citotóxico pode levar ao desenvolvimento de inflamações, justificando assim o efeito do óleo. Contudo, há no óleo diversas substâncias com efeito anti-inflamatório, o que pode levar a uma melhor modulação da resposta inflamatória, promovendo melhor cicatrização do tecido. Na tabela 09 (pág. 70) também está descrito a atividade biológica dos monoterpenos e sesquiterpenos sugeridos pela análise (ÇELIK *et al.*, 2014; JUN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013).

Tabela 09 – Compostos que estão presentes na camada superior e inferior e relatos na literatura

| Amostra | Pico | Composto | Espécie/Parte da Planta | Possível efeito |
|---------|------|---------------------------|---|---|
| CS | 3 | 3-noneno-2-one | <i>Ricinus communis</i> (Euphorbiaceae) semente (SBIHI <i>et al.</i> , 2018) | - |
| | *4 | Eucaliptol | <i>Croton rhamnifolioides</i> – folhas (MARTINS <i>et al.</i> , 2017) | Anti-inflamatório e imunomodulatório – suprime a ação NF-kB e citocinas. (HAN; PARKER,2017) |
| | *6 | Linalool | <i>Croton cajucara</i> – folhas. (Rosa <i>et al.</i> , 2003) | Anti-inflamatório, antinociceptivo – redução da inflamação via NF-kB (envolvido na resposta celular contra estresse, citocinas, radicais livres). (GUNASEELAN <i>et al.</i> , 2017; LI <i>et al.</i> , 2014) |
| | *7 | Terpineol | <i>Croton nepetaefolius</i> (MAGALHÃES <i>et al.</i> , 1998) | Antibacteriano e anti-inflamatório – suprime o fator de necrose tumoral, interleucina, prostaglandina e lipopolissacarídeo (LEE <i>et al.</i> , 2013) |
| | 8 | Cinamaldeído, (E)- | <i>Ditaxis heterantha</i> (Euphorbiaceae) – semente (DEL TORO-SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2006) | - |
| | *9 | Eugenol | <i>Croton adamantinus</i> –folhas (XIMENES <i>et al.</i> , 2013) | Antienvelhecimento, anti-inflamatório – suprime a ação da NF-kB, interleucinas e metaloproteínases. (GURPREET <i>et al.</i> , 2009) |
| | CI | **10 | Cariofilleno | <i>Croton antanosiensis</i> – folhas (RADULOVIC <i>et al.</i> , 2006) |
| 11 | | Cumarina | <i>Croton draco</i> – folhas (MURILLO, 2001) | -- |
| **14 | | Alfa.- Farneceno | <i>Ricinus communis</i> (Euphorbiaceae) (XIE <i>et al.</i> , 2012) | Antioxidante/pró-oxidante concentração dependente, citotoxicidade concentração- dependente. (ÇELIK <i>et al.</i> , 2014) |
| 20 | | L-Fenchona | <i>Alchornea cordifolia</i> – folhas (BONIFACE <i>et al.</i> , 2016) | |
| 21 | | Ácido n- Hexadecanoico | <i>Phyllanthus wightianus</i> – folhas (NATARAJAN <i>et al.</i> , 2014) | - |
| 25 | | Ácido Oleico | <i>Croton tiglium</i> – folhas (LIN <i>et al.</i> , 2016) | - |
| 26 | | Ácido Octadecanoico | <i>Jatropha gossypifolia</i> (Euphorbiaceae) – folhas (SAISHRI <i>et al.</i> , 2016) | - |
| 33 | | Ácido Palmitoleico | <i>Jatropha curcas</i> (Euphorbiaceae) – semente (KING <i>et al.</i> , 2009) | - |

Fonte: A autora (2019)

Nota: (*) monoterpeno; (**) sesquiterpenos

7 Considerações finais

Foi possível identificar as diferenças da atividade entre as amostras analisadas, principalmente relacionados ao efeito de *peeling* da fórmula de Hetter e da CI desta fórmula, o que gerou o aumento da espessura no epitélio, presença de células inflamatória após a aplicação no 1º dia e maior número de fibroblastos no 21º dia.

A diferenciação do colágeno tipo III e tipo I é um fato importante, visto que este *peeling* influencia na produção de colágeno, justificando o resultado de rejuvenescimento, sendo que maior quantidade de fibras de colágeno tipo III foram obtidas com o uso da FH e da CI dessa formulação.

A caracterização química trouxe suporte aos ensaios *in vivo*, principalmente os dados da CI, pois nela encontram-se muitos compostos pertencentes a classe dos terpenos, onde alguns compostos apresentam toxicidade dose-dependente. No entanto, outros apresentaram efeitos anti-inflamatórios, porém são compostos que precisam de estudos mais específicos e um estudo mais aprimorado em relação à composição química deste óleo, visto que pode ter outras substâncias que não foram identificadas e possivelmente possa apresentar outro tipo de atividade responsável pelo seu efeito pró-inflamatório.

Os ácidos graxos identificados na avaliação química do óleo de croton são utilizados como padrões para identificar a autenticidade do óleo e não seriam os responsáveis pela atividade observada.

Com a quimiometria foi possível correlacionar os cromatogramas do OC obtidos no decorrer de 3 meses. Foi considerado que o OC pode sofrer degradação, devido à redução na concentração de algumas substâncias, pois a mudança na característica do óleo ocorreu a partir da segunda semana de análise. Portanto, não é indicada a reutilização do óleo após aberto por tempos prolongados, o que compromete sua efetividade.

Por fim, conclui-se que há necessidade de maiores pesquisas sobre o assunto, testes mais profundos acerca do OC, principalmente sobre sua efetividade como *peeling*, pois no contexto histórico enfatizam que sua presença na fórmula promove um melhor efeito. Um dos focos futuros seria a possibilidade da substituição do fenol e um aprimoramento da fórmula, reduzindo sua desestabilidade.

Referências

- ADDOR, F. Beyond photoaging: additional factors involved in the process of skin aging. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, [s.l.], v. 11, n. 8; p. 437–443, 2018.
- ALVES, M. V. Checklist das espécies de Euphorbiaceae Juss. ocorrentes no semiárido pernambucano, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 485-495, 1998.
- AKILOV, O. E., DONOVAN, M. J., STEPINAC, T. CARTER, C. R., WHITCOMB, J. P., HASAN, T., MCDOWELL, M. A. T helper type 1 cytokines and keratinocyte growth factor play a critical role in pseudoepitheliomatous hyperplasia initiation during cutaneous leishmaniasis. **Archives of Dermatological Research**, [s.l.], v. 299, n. 7, p. 315-325, 2007.
- ARAÚJO, S. V., ROCHA, B. S., LUNA, F. M. T., ROLA JR., E. M., AZEVEDO, D. C. S., CAVALCANTE JR., C. L. FTIR assessment of the oxidation process of castor oil FAME submitted to PetroOXY and Rancimat methods. **Fuel Processing Technology**, [s.l.], v. 92, n. 5, p. 1152-1155, 2011.
- BABUSHOK, V.I. Chromatographic retention indices in identification of chemical compounds. **TrAC Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 69, p. 98-104, 2015.
- BAGATIN, E., HASSUN, K., TALARICO, S. Revisão sistemática sobre peelings químicos. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, São Paulo, v. 1, n. 1, p.37-46, 2009.
- BAKER, T. J. Chemical face peeling and rhytidectomy: A combined approach forfacial rejuvenation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.199-207, 1962.
- BARBA, J., RIBEIRO, E. R. Effects of Microdermoabrasion on the Facial skin Ageing. **Revista Inspirar**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.18-23, 2009.
- BASTO, S. R. L., ***Croton nummularius* Baill. (EUPHORBIACEAE) composição química, atividade biológica, antioxidante e toxicidade preliminar dos óleos essenciais**, 46 f., Dissertação (Mestrado), Programa de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- BONIFACE, P. K., FERREIRA, S. B., KAISER, C. R. Recent trends in phytochemistry, ethnobotany and pharmacological significance of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Muell. Arg. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 191, p. 216-244, 2016.
- BRERETON, R. G. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2003.
- BRANDÃO, M. D. G. L., SOUZA, J. P., GRAEL, C. F., GRAEL, V., SANTOS, A. C., SALIMENHA, M. F., MONTE-MÓR, R. L. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em minas gerais. **In Anais do XIV Seminário**

sobre a Economia Mineira [Proceedings of the 14th Seminar on the Economy of Minas Gerais]. Cedeplar, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

BUTLER, P. E. M., GONZALEZ, S., RANDOLPH, M. A., KIM, J., KOLLIAS, N., YAREMCHUK, M. J. Quantitative and qualitative effects of chemical peeling on photo-aged skin: An experimental study. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s.l.], v. 107, n. 1, p. 222-227, 2001.

CAI, G., ZHANG, X., HONG, Q., SHAO, F., SHANG, X., FU, B., FENG, Z., LIN, H., WANG, J., SHI, S., YIN, Z., CHEN, X. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 exacerbated renal interstitial fibrosis through enhancing inflammation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [s.l.], v. 23, n. 6, p. 1861-1875, 2008.

CARLSON, B. M. **Human Embryology and Developmental Biology**. 5^a.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos, **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

ÇELIK, K., TOĞAR, B., TÜRKEZ, H., TAŞPINAR, N. In vitro cytotoxic, genotoxic, and oxidative effects of acyclic sesquiterpene farnesene. **Turkish Journal of Biology**, [s.l.], v. 38, p. 253-259, 2014.

CHEN, H., WANG, Y., CAO, P., LIU, Y. Effect of temperature on thermal oxidation of palmitic acid studied by combination of EPR spin trapping technique and SPME-GC-MS/MS. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 234, p. 439-444, 2017.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia. In: Fundamentos de cromatografia**; [S.l.]: Unicamp, 2006.

CRONQUIST, A., **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press; 1981.

CUNHA, M. G., PARAVIC, F. D., MACHADO, C. A. Alterações histológicas dos tipos de colágeno após diferentes modalidades de tratamento para remodelamento dérmico: Uma revisão bibliográfica. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 285-291, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DUNLOP, P., BIGNELL, C., JACKSON, J., HIBBERT, D. Chemometric analysis of gas chromatographic data of oils from Eucalyptus species. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 59-67, 1995.

EL-DOMYATI, M., ATTIA, S., SALEH, F., BROWN, D., BIRK, D. E., GASPARRO, F., AHMAD, H., UITTO, J., Intrinsic aging vs. photoaging: A comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. **Experimental Dermatology**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 398-405, 2002.

EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES; **European Pharmacopeia**; 6^a ed., v. 2; 2008.

FISCHER, T. C., PEROSINO, E., POLI, F., VIERA, M. S., DRENO, B. Chemical peels in aesthetic dermatology: An update 2009. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 281-292, 2010.

FREI, J. V. Chemically Induced Regressing Experimental Epidermal Tumors in Mice. **Cancer Research**, [s.l.], v. 24, n. 6, p. 1083-1084, 1964.

GAD, H. A., EL-AHMADY, S. H., ABOU-SHOER, M. I., AL-AZIZI, M. M. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. **Phytochemical Analysis**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 1-24, 2012.

GENESER, F. **Histologia: com bases moleculares**, 3^a.ed. Buenos Aires: Médica Panamericana/ Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GOEL, G., MAKKAR, H., FRANCIS, G., BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

GONSER, P., KAESTNER, S., JAMINET, P., KAYE, K., Histological caseecontrol study of peeling- induced skin changes by different peeling agents in surgically subcutaneous undermined skin flaps in facelift patients. **An International Journal of Surgical Reconstruction**, [s.l.], v. 70, n. 11, p. 1660-1665, nov./2017.

GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12. ed. Porto Alegre: ABDR, 2012.

GUNASEELAN, S., BALUPILLAI, A., GOVINDASAMY, K., RAMASAMY, K., MUTHUSAMY, G., SHANMUGAM, M., THANGAIYAN, R., ROBERT, B., NAGARAJAN, R., PONNIRESAN, V., RATHINARAJ, P., Linalool prevents oxidative stress activated protein kinases in single UVB-exposed human skin cells. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 1-20, 2017.

GURPREET, K., MOHAMMAD, A., SARWAR, A. M., Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**, [s.l.], v. 49, n. 3, p. 290-301, 2009.

HADDAD, L. M., DIMOND, K. A., SCHWEISTRIS, J. E., Phenol Poisoning. **Journal of the American College of Emergency Physicians**, [s.l.], v. 8, n. 7, p. 267-269, jul./1979.

HAN, A., CHIEN, A. L., KANG, S. Photoaging. **Dermatologic Clinics**, [s.l.], v. 32, n. 3, p. 291-299, 2014

HADLER, W. A., SILVEIRA, S. R., **Histofisiologia dos epitélios: correlação entre a morfologia e a função dos epitélios**. Campinas: Ed. da UNICAMP; 1993.

HAN, X., PARKER, T. L., Cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil significantly inhibits vascular cell adhesion molecule 1 and impacts genome-wide gene expression in human dermal fibroblasts. **Cogent Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 1-7, 2017.

HANRAHAN G., GOMEZ F. A., **Chemometric methods in capillary electrophoresis**. John Wiley & Sons; 2009.

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

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**, [s.l.], v. 105, n. 1, p. 240-248, 2000, b.

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

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**, [s.l.], v. 105, n. 1, p. 1063-1083, 2000, d.

HIROTA, B.C.K; TREVISAN, R. R., DIAS, J. F. G., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G; Phytochemistry and biological activities of genus *Jatropha*: mini-review. **Visão Acadêmica**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 103-112, 2010.

HIROTA, B. C. K. **Estudo fitoquímico e das propriedades biológicas de *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae)**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

HU, J., GAO, W. Y., MA, L., MAN, S., HUANG, L., LIU, C., Activation of M3 muscarinic receptor and Ca²⁺ influx by crude fraction from *Crotonis Fructus* in isolated rabbit jejunum. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 139, n. 1, p. 136-141, 2012.

ISAAC, V. L. B., CEFALI, L. C., CHIARI, B. G., OLIVEIRA, C., SALGADO, H., CORRÊA, M., Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

JONAS, W. B., LEVIN, J. S. **Tratado de Medicina Complementar E Alternativa**. Barueri: Editora Manole Ltda, 621 p., 2001.

JUN, N. J., MOSADDIK, A., MOON, J. Y., JANG, K.-C., LEE, D.-S., AHN, K. S., CHO, S. K., Cytotoxic activity of β -caryophyllene oxide isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf. **Records of Natural Products**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 242-246, 2011.

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

KADUNC, B. V., **Ácido pirúvico: técnica de padronização para uso em esfoliações químicas, através de estudo experimental**; Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Dermatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

KADUNC, B., **Tratado de cirurgia dermatológica, cosmiatria e laser: da Sociedade Brasileira de Dermatologia**. Elsevier, 2013.

KIM, M., KIM, H-R., SO, H-S., LEE, Y-R., MOON, H-C., RYU, D-G., YANG, S-H., LEE, G-S., SONG, J-H., KWON, K-B., Crotonis Fructusand Its Constituent, Croton Oil, Stimulate Lipolysis in OP9 Adipocytes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2014, n. 1, p.1-5, 2014.

KING, A. J., BROWN, G. D., GILDAY, A. D., LARSON, T. R., GRAHAM, I. A. Production of Bioactive Diterpenoids in the Euphorbiaceae Depends on Evolutionarily Conserved Gene Clusters. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 26, n. 8, p. 3286–3298, 2014.

KING, A. J., HE, W., CUEVAS, J. A., FREUDENBERGER, M., RAMIARAMANANA, D., GRAHAM, I., Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 60, p. 2897-2905, 2009.

LANDAU, M. Advances in deep chemical peel. **Dermatology Nursing**, [s.l.], v. 17, n. 16, p. 438–441, 2005.

LANDAU, M., Cardiac Complications in Deep Chemical Peels. **Dermatologic Surgery**, [s.l.], 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**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 47-53, 2009.

LEE, C. J., CHEN, L. W., CHEN, L. G., CHANG, T., HUANG, C., HUANG, M., WANG, C., Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 169-176, 2013.

LEONARDI, G R; MATHEUS, L G M., **Cosmetologia aplicada**. Livraria Editora Medfarma, cap. 2, p. 13-31, 2005.

LI, J., ZHANG, X., HUANG, H., Protective effect of linalool against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in mice. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 523-529, 2014.

LIN, H. C., KUO, Y. L., LEE, W. J., YAP, H. Y., WANG, S. H., Antidermatophytic Activity of Ethanolic Extract from *Croton tiglium*. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2016, p. 1-6, 2016.

LYNCH, J. M. Understanding pseudoepitheliomatous hyperplasia. **Pathology Case Reviews**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 36-45, 2004.

MAEDER, M., NEUHOLD, Y. M., PUXTY, G., GEMPERLINE, P., Advances in the modelling and analysis of complex and industrial processes. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s.l.], v. 82, n. 1-2, p. 75-82, 2006.

MAGALHÃES, P. J. C., CRIDDLE, D. N., TAVARES, R. A., MELO, E., MOTA, T., LEAL-CARDOSO, J., Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 172-177, 1998.

MARCONDES SARI, M. H., SOUZA, A. C. G., ROSA, S. G., Chagas P., Da Luz, S., Rodrigues, O., Nogueira, C., Biochemical and histological evaluations of anti-inflammatory and antioxidant p-chloro-selenosteroid actions in acute murine models of inflammation. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 781, p. 25–35, 2016.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. C., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, R. A., GUERRA-TAPIA, A. Aesthetic dermatology and emotional well-being questionnaire. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 336–345, 2014.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. C., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, R-a., GUERRA-TAPIA, A. Esthetic dermatology and emotional well-being according to gender. **Journal Of Cosmetic Dermatology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.410-416, 2018.

MARTINS, A. O. B. P. B., RODRIGUES, L. B., CESÁRIO, F. R. A. S., OLIVEIRA, M., TINTINO, C., CASTRO, F., ALCÂNTARA, I., FERNANDES, M., ALBUQUERQUE, T., SILVA, M., ARAÚJO, A. S., JÚNIUR, L., COSTA, J., MENEZES, I., WANDERLEY, A., Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1,8-cineole (eucalyptol). **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 96, p. 384-395, 2017.

MONTEIRO, O. S., **Caracterização do óleo essencial da Pimenta dioica Lindl. e sua aplicação como atrativo de abelhas euglossina**, 148 f., Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

MWINE, J. T., VAN DAMME, P., Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features, **Journal of Medicinal Plants Research**, [s.l.], v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.

HOEPERS, S. M., SOUZA, H. G. M. T., QUINTÃO, N. L. M., SANTIN, J. R., FILHO, V. C., SILVA, R., COUTO, A. G., SILVA, K. S., Topical anti-inflammatory activity of semisolid containing standardized *Aleurites moluccana* L. Willd (Euphorbiaceae) leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 173, p. 251-255, 2015.

MANSUR, P. H. G., CURY, L. K. P., DESTRO-FILHO, J. B., RESENDE, E.S., DESTRO, J. P. B., OLIVEIRA, L. M., MORAES, D. C. G., FREITAS, G. R. R., ROCHA, L. S. S. Análise de Registros Eletrocardiográficos Associados ao Infarto Agudo do Miocárdio. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, [s.l.], v. 87, n. 2, p. 106–114, 2006.

- MASSART, D. L., **Handbook of chemometrics and qualimetrics**. Elsevier; 1997.
- METELITSA, A. I., ALSTER, T. S. Fractionated laser skin resurfacing treatment complications: A review. **Dermatologic Surgery**, [s.l.], v. 36, n. 3, p. 299-306, 2010.
- MENOITA, E., SANTOS, V., SANTOS, A. S., A pele na pessoa idosa; **Journal of Aging and Innovation**, [s.l.], v. 2; n. 1, p. 1-17, 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, SOCIEDADE PAN-AMERICANA DE SAÚDE; **Inovação em temas estratégicos de saúde pública**; Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, MS; Brasília, 2011.
- NASCIMENTO, A. K. L., **Atividade antioxidante e entiproliferativa de extratos de folhas de Plukenetia volubilis L. (Euphorbiaceae)**, 71 f., Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.
- NASCIMENTO, S. S., **Interação da pele humana com fenol: determinação do mecanismo e caracterização do efeito de peeling**, Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2007.
- NATARAJAN, D., SRINIVASAN, R., SHIVAKUMAR, M. S. Phyllanthus wightianus müll. Arg.: A potential source for natural antimicrobial agents. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2014, p. 1-9, 2014.
- NISHIKI, K., NISHINAGA, K., KUDOH, D., IWAI, K., [Croton oil-induced hemorrhoid model in rat: comparison of anti-inflammatory activity of diflucortolone valerate with other glucocorticoids]. **Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica**, [s.l.], v. 92, n. 4, p. 215-25, 1988.
- ODO, M. E. V., CHICHIERCHIO, A. L., **Práticas em cosmiatria e medicina estética: procedimentos cirúrgicos de pequeno porte; São Paulo**. Tecnopress, p. 82-85, 1998
- OIIVEIRA, L. P., **Estudo de oleaginosas alternativas para a produção de biodiesel e bio-óleo**, 76 f., Dissertação (Mestrado), Programa de Pós- Graduação em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
- PAGANI, A., GAETA, S., SAVCHENKO, A. I., WILLIAMS, C. M., APPENDINO, G., An improved preparation of phorbol from croton oil. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 13, p. 1361–1367, 2017.
- PARK, D. C., YEO, S. G. Aging. **Korean journal of audiology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 39–44, 2013.
- PATTI, G. J., YANES, O., SIUZDAK, G., Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 263-269, 2012.
- PAYO, H. A., DOMINICIS, M. E., MAYOR, J., OQUENDO, M., SARDUY, R., Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género Croton L. **Revista Cubana de Farmácia**, [s.l.], v.35, n. 3, p. 203-206, 2001

PEDROSA, F. C., **Cromatografia Gasosa aplicada em Estudos de Metabolômica**. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

PETROVSKA, B., Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, [s.l.], v. 6, n. 11, p. 1–5, 2012.

PREBIHALO, S. E., BERRIER, K. L., FREYE, C. E., BAHAGHIGHAT, H. D., MOORE, N. R., PINKERTON, D. K., SYNOVEC, R. E., Multidimensional Gas Chromatography: Advances in Instrumentation, Chemometrics, and Applications. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 90, n. 1, p. 505–532, 2018.

RADULOVIĆ, N., MANANJARASOA, E., HARINANTENAINA, L., YOSHINORI, A., Essential oil composition of four Croton species from Madagascar and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s.l.], v. 34, n. 8, p. 648-653, 2006.

RAMDIAL, P. K., KHARSANY, A. B. M., REDDY, R., CHETTY, R., Transepithelial elimination of cutaneous vulval granuloma inguinale. **Journal of Cutaneous Pathology**, [s.l.], v. 27, n. 10, p. 493-499, 2000.

ROSA, M., MENDONÇA-FILHO, R., BIZZO, H., RODRIGUES, I., SOARES, R., SOUTO-PADRÓN, T., ALVIANO, C., LOPES, A., Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from Croton cajucara. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 47, n. 6, p. 1895–1901, 2003.

ROSS, M. H., PAWLINA, W., **Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

RUIVO, A. P., **Envelhecimento Cutâneo: fatores influentes, ingredientes ativos e estratégias de veiculação**, Universidade Fernando Pessoa, 2014.

SAISHRI, R., RAVICHANDRAN, N., VADIVEL, V., BRINDHA, P. Pharmacognostic studies on leaf of Jatropha Gossypifolia L. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 163-173, 2016.

SANTOS, H. S., MESQUITA, F. M. R., LEMOS, T. L. G., MONTE, F. J. Q., BRAZ-FILHO, R. Diterpenos casbanos e acetofenonas de Croton nepetaefolius (Euphorbiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 601–604, 2008.

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

SARI, M. H. M., SOUZA, A. C. G., ROSA, S. G., CHAGAS, P. M., LUZ, S. C. A., RODRIGUES, O. E. D., NOGUEIRA, C. W., Biochemical and histological evaluations of anti-inflammatory and antioxidant p-chloro-selenosteroid actions in acute murine models of inflammation. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 781, p. 25–35, 2016.

SETYADI, H. G., JACOBS, A. A., MARKUS, R. F., Infectious complications after nonablative fractional resurfacing treatment. **Dermatologic Surgery**, [s.l.], v. 34, n. 11, p. 1595-1898, 2008.

SBIHI, H. M., NEHDI, I. A., MOKBLI, S., ROMDHANI-YOUNES, M., AL-RESAYES, S. I. Hexane and ethanol extracted seed oils and leaf essential compositions from two castor plant (*Ricinus communis* L.) varieties. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 122, p. 174-181, 2018.

SCHNEIDER, R. C. S., **Extração, caracterização e transformação do óleo de rícino**. 205 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2003.

SHLAMOVITZ, G. Z., GUPTA, M., DIAZ, J. A., A case of acute keratoconjunctivitis from exposure to latex of *Euphorbia tirucalli* (pencil cactus); **Journal of Emergency Medicine**, [s.l.], v. 36, n. 3, p. 239-241, 2009.

SKOCZYŃSKA, A., BUDZISZ, E., PODGÓRNA, K., ROTSZTEJN, H. Paxillin and its role in the aging process of skin cells. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczonej**, [s.l.], v. 70, n. 503, p. 1087–1094, 2016.

SKOOG, D. A., **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [S.l.]: Grupo Editorial Norma, 2006.

SOUZA, M. S., **Aplicações da Espectrometria de Massas e da Cromatografia Líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**, 162 f., Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

STEPHEN, T. L. D., PERERA, A. T-m., Judging the Difference between Attractiveness and Health: Does Exposure to Model Images Influence the Judgments Made by Men and Women?; **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1-8, 2014.

STIRPE, F., PESSION-BRIZZI, A., LORENZONI, E., STROCCHI, P., MONTANARO, L., SPERTI, S., Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas* . Toxic properties and inhibition of protein synthesis in vitro. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 156, n. 1, p. 1–6, 1976.

STONE, P. A., The use of modified phenol for chemical face peeling. **Clinics in Plastic Surgery**. [s.l.], v. 25, p. 21-43, 1997.

SU, S., HUA, Y., DUAN, J. A., SHANG, E., TANG, Y., BAO, X., LU, Y., DING, A., Hypothesis of active components in volatile oil from a Chinese herb formulation, “Shao-Fu-Zhu-Yu decoction”, using GC-MS and chemometrics. **Journal of Separation Science**, [s.l.], v. 31, n. 6-7, p. 1085-1091, 2008.

SWINGLE, K. F., REITER, M. J., SCHWARTZMILLER, D. H., Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, [s.l.], v. 254, n. 1, p. 168-176, 1981.

TAGLIOLATTO, S., ENOKIHARA, M., ALCHORNE, M. M. A., Hiperplasia sebácea cutânea: estudo piloto para a correlação da doença com hormônios androgênicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 86, n. 5, p. 917–923, 2011.

THOMAS, J. R., DIXON, T. K., BHATTACHARYYA, T. K., Effects of Topicals on the

Aging Skin Process. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 55–60, 2013.

TORO-SÁNCHEZ, L., SÁNCHEZ, S., ORTIZ, M. A., VILLANUEVA, S., LUGO-CERVANTES, E. Generation of aroma compounds from *Ditaxis heterantha* by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 72, n. 1, p. 155-162, 2006.

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**, [s.l.], v. 94, n. 1, p. 60–66, 2004.

TURNER, N. J., PEZZONE, D; BADYLAK, S. F.. Regional Variations in the Histology of Porcine Skin. **Tissue Engineering Part C: Methods**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.373-384, 2015

VAN DAMME, P. L. J., *Euphorbia tirucalli* for high biomass production, in: A. Schlissel and D. Pasternak (Eds.), Combating desertification with plants, **Kluwer Academic Pub.** [s.l.], p. 169-187, 2001

VAN DE GRAAFF, K. M., **Anatomia Humana**; Barueri; Manole; 2003.

VAN DUUREN, B. L., LANGSETH, L., SIVAK, A., ORRIS, L., The tumor-enhancing Principles of *Croton tiglium* L. II. A Comparative Study. **Cancer Research**, [s.l.], v. 26, n. 8, p. 1729–1733, 1966.

VELASCO, M. V. R., RIBEIRO, M. E., BEDIN, V., OKUBO, F. R., STEINER, D. Rejuvenescimento da pele por peeling químico: Enfoque no PF. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 79, n. 1, p. 91–99, 2004.

VENUS, M., WATERMAN, J., MCNAB, I., Basic physiology of the skin. **Surgery (oxford)**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.471-474, 2011.

VIGNERON, J.-I.h., MUGGENTHALER, F., Peeling mit Phenol. **Journal Für Ästhetische Chirurgie**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 9-19, 2015.

WAMBIER, C. G., FREITAS, F. P. DE. Combining Phenol-Croton Oil Peel. **Chemical and Physical Peelings**, [s.l.], p. 1-13, 2016.

WAMBIER, C. G., LEE, K. C., SOON, S. L., STERLING, J. B., RULLAN, P. P., LANDAU, M., BRODY, H. J., Advanced chemical peels: phenol-croton oil peel. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 81, n. 2, p. 327-336, 2018.

WANG, J. F., YANG, S. H., LIU, Y. Q., LI, D-X., HE, W-J., ZHANG, X-O-X., LIU, Y-H., ZHOU, X-J., Five new phorbol esters with cytotoxic and selective anti-inflammatory activities from *Croton tiglium*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 25, n. 9, p. 1986–1989, 2015.

WANG, X., LAN, M., WU, H., SHI, Y., LU, J., DING, J., WU, K., JIN, J., FAN, D. M., Direct effect of croton oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. **World Journal of Gastroenterology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 103–107, 2002.

WATANABE, N., MASUBUCHI, D., ITOH, M., TERADU, S., YAZAWA, H., UEMURA, H., Oral administration of whole dihomo- γ -linolenic acid-producing *Saccharomyces cerevisiae* suppresses cutaneous inflammatory responses induced by croton oil application in mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 98, n. 20, p. 8697-8706, 2014.

XIE, X., KIRBY, J., KEASLING, J. D., Functional characterization of four sesquiterpene synthases from *Ricinus communis* (Castor bean). **Phytochemistry**, [s.l.], v. 78, p. 20-28, 2012.

XIMENES, R. M., NOGUEIRA, L. N., CASSUNDÉ, N. M. R., VIANA, G. S. B., XIMENES, R. M., SANTOS, S. M., MAGALHÃES, L. P. M., SENA, K. X. F. R., ALBUQUERQUE, J. F. C., NOGUEIRA, L. M., CASSUNDÉ, N. M. R., MARTINS, R. D., ARAÚJO, R. M., Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. Essential oil. **Journal of Natural Medicines**, [s.l.], v. 67, n. 4, p. 758-764, 2013.

YAGI, S., BABIKER, R., TZANOVA, T., SCHOHN, H. Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 8, p. 763–770, 2016.

ZANINI, M; M FILHO, C D A S. Terapia despigmentante para vitiligo generalizado com solução tópica de fenol 88%. **Anais Brasileiros de Cosmetologia**, São Paulo, v. 80, n. 4, p.415-416, 2005

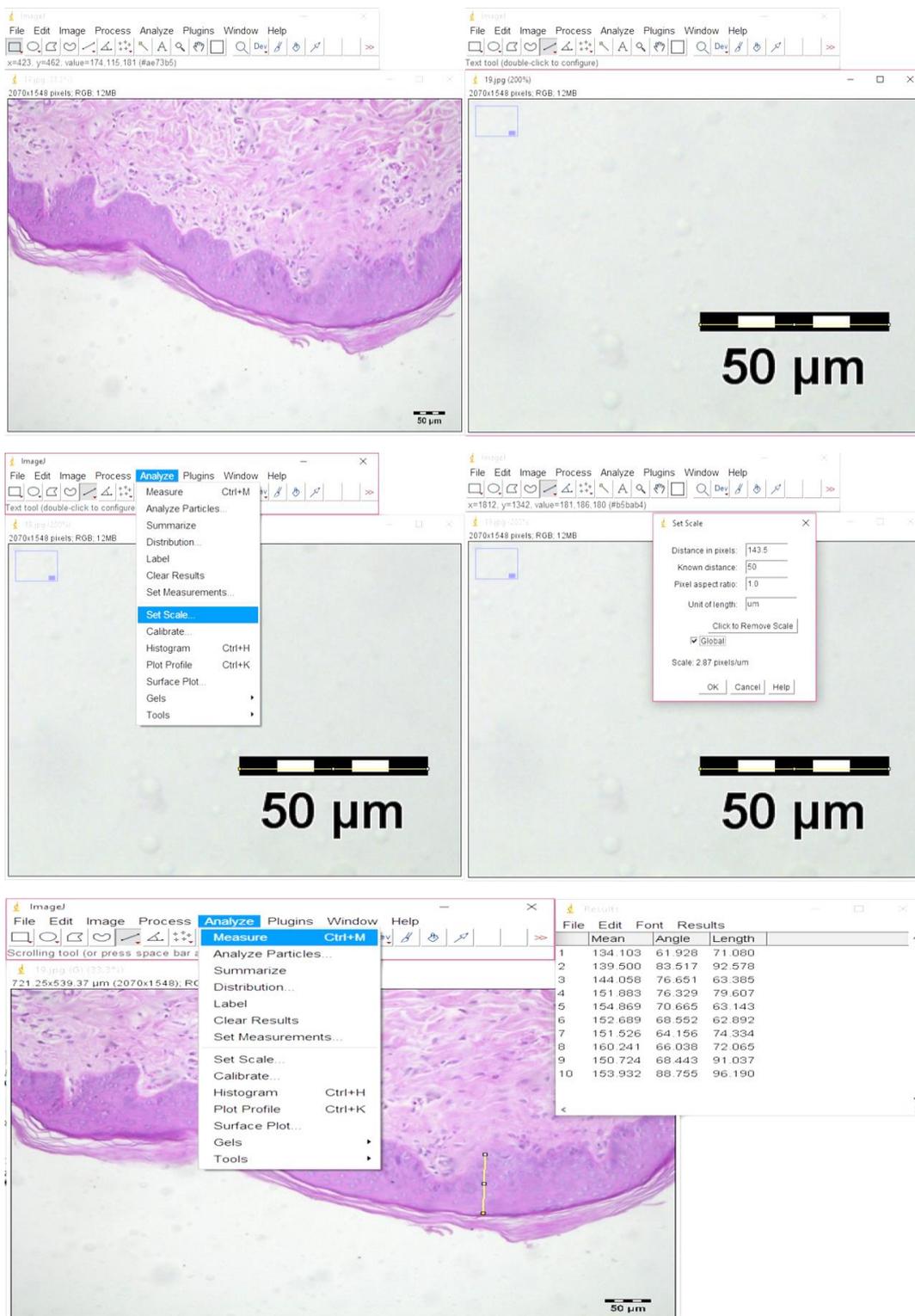
ZASLAVSKY, C., GUS, I., Idoso: Doença Cardíaca e Comorbidades. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], v. 79, n. 6, p.635-639, 2002.

ZHANG, A., SUN, H., WANG, X., Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 404, n. 4, p.1239-1245, 2012.

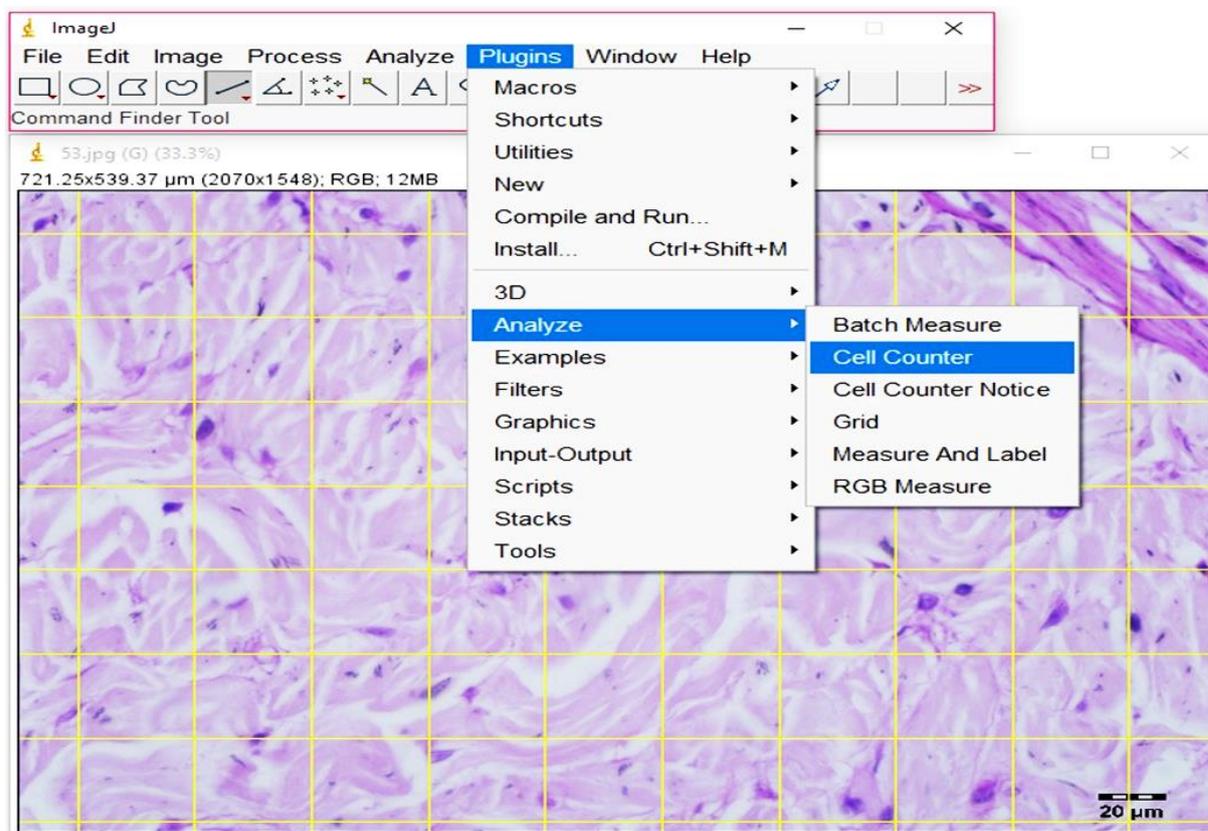
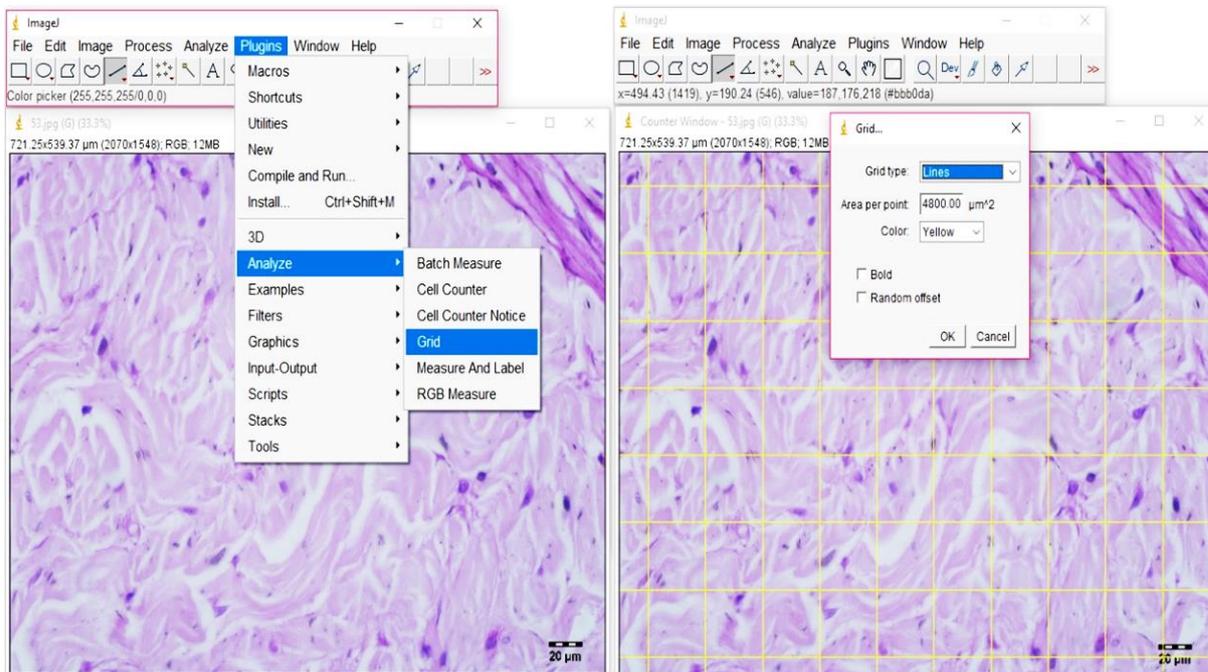
ZHANG, X. L., WANG, L., LI, F., YU, K., WANG, M. K. Cytotoxic phorbol esters of *Croton tiglium*. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 76, n. 5, p. 858–864, 2013.

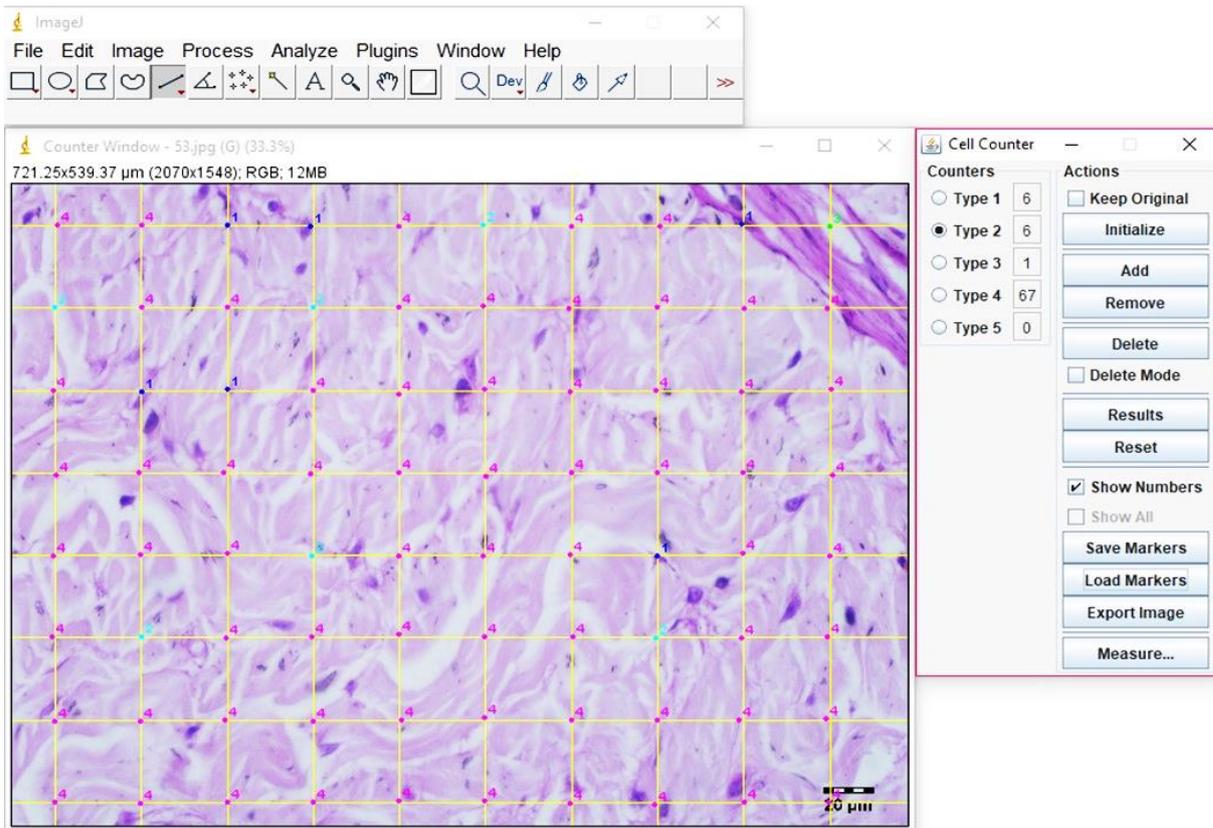
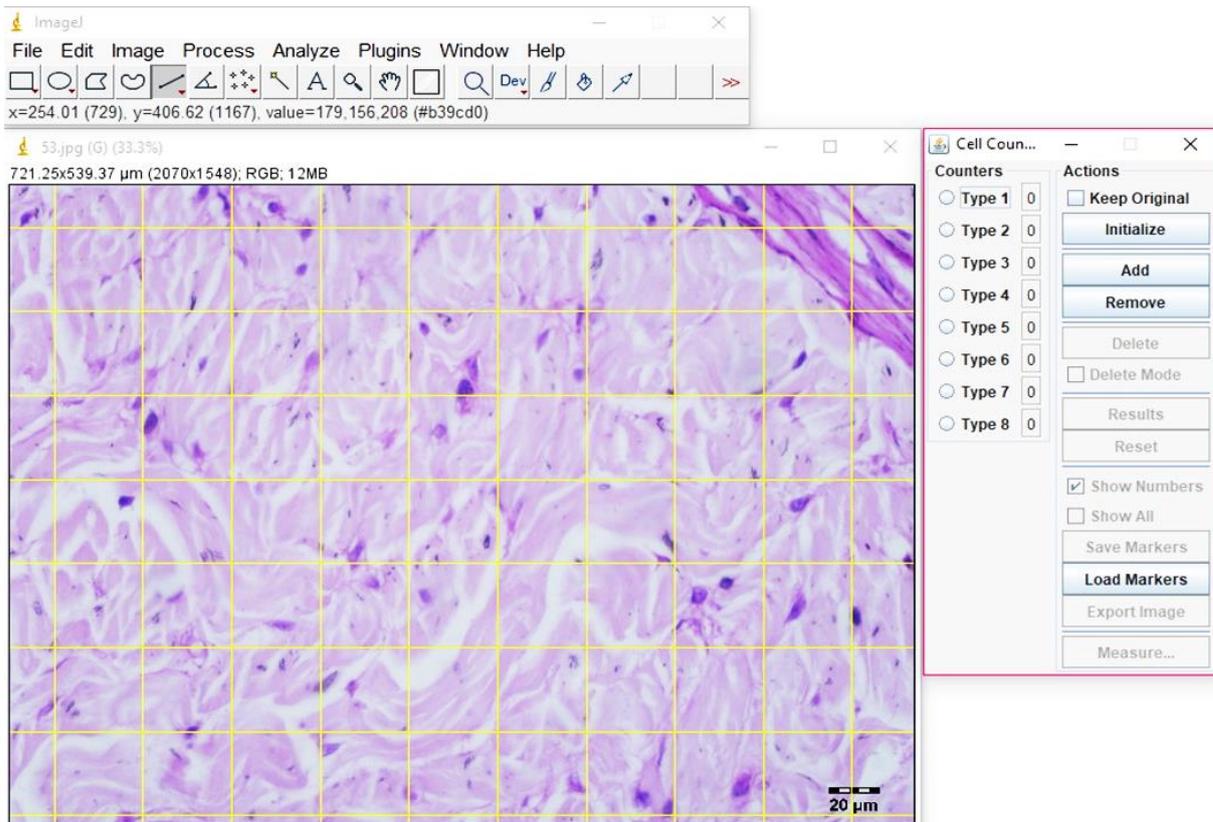
ZHANG, D. D., ZHOU, B., YU, J. H., XU, C-H., DING, J., ZHANG, H., YUE, J-M., Cytotoxic tigliane-type diterpenoids from *Croton tiglium*. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 71, n. 52, p. 9638–9644, 2015.

Apêndice A – Método de análise da espessura do epitélio através do programa Image J®



Apêndice B – Método de análise e contagem dos elementos teciduais através do programa Image J®





Anexo A – Carta de aprovação do comitê de ética



UEPG

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 034/2017

Protocolo UEPG – 16590/2017

Título – Solicita autorização de uso de animais nos projetos “Caracterização química e avaliação da atividade toxicológica do óleo de Croton tiglium” e “Desenvolvimento tecnológico de produto a base de óleo de Croton tiglium”

Interessado: Flávio Luis Beltrame

Data de Entrada – 13/09/2017

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 22/09/2017 a 22/09/2019

Considerações

Professor Doutor Flávio Luis Beltrame:

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da autorizada a utilização de 16 suínos (8 machos e 8 fêmeas) de 4-5 meses e 30-35 kg.

Ponta Grossa, 22 de setembro de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais
Dra. Dionizila Xavier Scamparini
Coordenadora