

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

ALINE DA SILVA JUSTO MACHADO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE CRÓTON COMO POTENCIAL AGENTE  
EM TRATAMENTOS ESTÉTICOS *ANTIAGE*

PONTA GROSSA

2024

ALINE DA SILVA JUSTO MACHADO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE CRÓTON COMO POTENCIAL AGENTE  
EM TRATAMENTOS ESTÉTICOS *ANTIAGE*

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutora em Ciências Farmacêuticas na  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.  
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Wambier.

PONTA GROSSA

2024

M149 Machado, Aline da Silva Justo  
Avaliação dos efeitos do óleo de Cróton como potencial agente em  
tratamentos estéticos *antiage* / Aline da Silva Justo Machado. Ponta Grossa, 2024

92 f.



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

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Wambier.

1. Croton tiglium. 2. Peeling de fenol. 3. Colágeno. 4. Estética. 5. Ácido  
tricloroacético. I. Beltrame, Flávio Luis. II. Wambier, Carlos Gustavo. III.  
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências  
Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615

 <p>UNICENTRO pública e gratuita</p>	<p align="center"><b>PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS</b></p> <p align="center">Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa</p>	 <p>PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS UEPG</p>
---	---	---

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO **03/2023** DA DOUTORANDA **ALINE DA SILVA JUSTO MACHADO**, REALIZADA NO DIA 10 DE MARÇO DE 2023, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dez dias do mês de março de dois mil e vinte e três, às 14h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, no Auditório do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, sala 115, Bloco M, sob a presidência do Professor Doutor Flávio Luís Beltrame, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda **ALINE DA SILVA JUSTO MACHADO**, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pelo Professor Doutor FLÁVIO LUÍS BELTRAME (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): ADRIANA YURIKO KOGA (UEPG/PR); BRUNO RODRIGO MINOZZO (UNICESUMAR/PR); LUIZA STOLZ CRUZ (UNICENTRO/PR); e PRISCILEILA COLERATO FERRARI (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE CRÓTON COMO POTENCIAL AGENTE EM TRATAMENTOS ESTÉTICOS ANTIAGE".

Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a Tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Dissertação de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, 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 (UEPG/PR)  
 Presidente

  
 ADRIANA YURIKO KOGA  
 (UEPG/PR)  
 Titular

  
 BRUNO RODRIGO MINOZZO  
 (UNICESUMAR/PR)  
 Titular

  
 LUIZA STOLZ CRUZ  
 (UNICENTRO/PR)  
 Titular

  
 PRISCILEILA COLERATO FERRARI  
 (UEPG/PR)  
 Titular

Dedico ao Deus da minha vida tudo o que foi realizado até aqui, aos meus pais Marcos e Rosangela, ao meu esposo Cesar, a minha amiga e irmã Tathiana e ao meu orientador Dr. Flávio que se tornou um pai da ciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Não posso deixar de agradecer a Deus primeiramente por todos os projetos e sonhos para a minha vida, e a pós-graduação foi um sonho gerado primeiro no coração Dele. Agradeço pela capacitação, pelo sustento e por estar presente em todo momento de dificuldade encontrada.

O que seria de mim sem o apoio, compreensão e incentivo do meu esposo Cesar. Também agradeço à minha família, meus pais Marcos e Rosangela pelo apoio e investimento em toda minha carreira acadêmica, a minha amiga e irmã Tathiana que sempre estava a disposição para me ajudar principalmente para ouvir-me em todos os momentos que precisava de uma amiga.

Agradeço aos meus colegas de laboratório pelo apoio, amizade e ajuda. O laboratório M23 não é apenas uma equipe, é uma família. Agradeço em especial a colega Bruna Mikulis Lemes pois compartilhamos dos mesmos objetivos desenvolvendo nossos projetos em parceria.

Ao meu orientador toda gratidão, Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame, por conduzir e dar suporte em todos os momentos, por todo conhecimento compartilhado juntamente com o Prof. Dr. Carlos Gustavo Wambier para a realização desse estudo.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro e à UEPG pela formação acadêmica e recursos aplicados para a execução de todo o projeto e pesquisa.

Aos amigos e colegas que auxiliaram e que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse o meu objetivo nesse tempo, a conclusão dessa pesquisa.

“Deus nunca disse que a jornada seria fácil, mas  
ele disse que a chegada valeria a pena”.  
(Max Lucado)

## RESUMO

Entre os procedimentos estéticos procurados e que são de baixo custo estão os *peelings* que consistem na descamação controlada da pele por meio de um estímulo pró-inflamatório, seja pela acidez do produto aplicado ou por mecanismos diferenciados dos princípios ativos. Com esse estímulo ocorre a recuperação tecidual, remoção de imperfeições como cicatrizes e manchas, e auxílio no rejuvenescimento com o estímulo da produção de colágeno. A fórmula de Hetter (FH), que contém óleo de Cróton (OC) e fenol como principais ativos, age na derme reticular, considerado, portanto, um *peeling* profundo, porém poucos estudos estão relacionados e justificam o emprego do óleo de Croton na fórmula. O óleo contém componentes específicos como ésteres de forbóis que possuem ação pró-inflamatória. Esse trabalho propõe avaliar a ação do OC isoladamente e incorporada em formulações com a finalidade de *peeling*. Para isso foram avaliadas 10 formulações que foram aplicadas em porcos (dois machos e duas fêmeas) e foram retiradas biópsias nos dias 1, 7 e 21 após a aplicação. A partir das biópsias foram preparadas lâminas de microscopia que foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina para a quantificação de células, colágeno e substância fundamental. A técnica de *Picrosirius Red* foi utilizada para a quantificação e diferenciação de colágeno tipo I e tipo III, e a coloração Fontana Masson para contagem de melanina. Os resultados foram organizados em 5 abordagens. Na abordagem 1 as amostras da fórmula de Hetter com solução estoque de 3 meses (FH3) e as amostras da solução estoque sem diluição (SE) foram comparadas com o C<sup>-</sup> (água e Septisol®) e o C<sup>+</sup> (fórmula de Hetter); como resultados obtidos a FH3 apresentou menor eficácia que o C<sup>+</sup>, indicando que as características químicas da solução estoque, após armazenamento, sofreram alteração e podem alterar a ação biológica esperada; a SE apresentou resultados similares aos observados para o C<sup>+</sup>. Na segunda abordagem foram avaliadas as amostras, contendo fenol, mas sem OC (SO) e a fórmula contendo OC, mas sem fenol (SF). e comparadas com os controles. Observou-se que as SO e SF não apresentaram resultados tão eficaz quanto o C<sup>+</sup>. Entretanto foi determinado que ocorreu inflamação próxima a epiderme após a análise da SF. Na abordagem 3 foi comparada a ação da IOC (aplicação intradérmica do OC) e da TAT NAN (aplicação intradérmica da tinta de nanquim) com os grupos controles, nessa abordagem observou-se intensa inflamação produzida pela IOC e consequente reestruturação tecidual com intensa produção de colágeno, característica não observada para a TAT NAN. Tal dado pode reforçar que o OC tem atividades pró-inflamatórias e de modulação da inflamação no *peeling*, mas é necessária uma forma de aplicação que permita a permeação do OC na pele. Na abordagem 4 foi proposto possíveis substituintes ao fenol, AG (OC com AG) e ATA (OC com ATA); o grupo tratado com a ATA apresentou resultados melhores que o grupo após aplicação da fórmula com AG. Para finalizar, na abordagem 5 foi avaliado a ação da FH em porcos de pelagem escura, observando-se redução significativa na quantidade de melanina comparado com o C<sup>-</sup>, podendo-se inferir que a FH não é indicada para fototipos IV-VI segundo a escala de Fitzpatrick por causar hipocromia. No geral houve grande evolução no conhecimento científico sobre a função do OC em *peelings*, visto que se comprovou que os compostos químicos presentes na matriz vegetal que compõem a formulação é que são responsáveis pela função pró-inflamatória e favorecimento da produção de colágeno, porém devem ser avaliados seus mecanismos e a busca por novas fórmulas mais seguras e estáveis.

**Palavras-chave:** *Peeling*, Ácido tricloroacético, Ácido glicólico, Colágeno.



## ABSTRACT

Among the sought-after aesthetic procedures that are low cost are *peelings* that consist of controlled desquamation of the skin by means of a pro-inflammatory stimulus, either by the acidity of the product applied or by mechanisms different from other agents. With this stimulus, tissue recovery occurs, removal of imperfections such as scars and stains, and aid in rejuvenation by stimulating collagen production. The Hetter formula (FH), which contains Croton oil (OC) and phenol as the main actives, acts on the reticular dermis, therefore considered a deep *peeling*, but few studies are related and justify the use of Croton oil in the formula. The oil contains specific components such as phorbol esters that have pro-inflammatory action. This work proposes to evaluate the action of OC alone and incorporated in formulations with the purpose of *peeling*. For this, ten formulations that were applied to pigs (two males and two females) were evaluated and biopsies were taken on days 1, 7 and 21 after application. Microscopy slides were prepared from the biopsies and stained using the hematoxylin and eosin technique to quantify cells, collagen, and fundamental substance. The *Picrosirius Red* technique was used for the quantification and differentiation of type I and type III collagen, and Masson's Fontana stain for melanin counting. The results were organized into five approaches. In approach 1, samples of the Hetter formula with a 3-month stock solution (FH3) and samples of the undiluted stock solution (SE) were compared with C- (water and Septisol®) and C+ (Hetter formula). The results indicated that FH3 showed lower efficacy than C+, suggesting that the chemical characteristics of the stock solution, after storage, had undergone alteration potentially affecting the expected biological action. SE showed similar results to those observed for C+. In the second approach, samples containing phenol but no OC (SO) and the formula containing OC but no phenol (SF) were evaluated and compared with controls. It was observed that SO and SF did not show results as effective as C+. However, inflammation near the epidermis was determined after the analysis of SF. In approach 3, the action of IOC (intra-dermal application of OC) and TAT NAN (intra-dermal application of India ink) were compared with control groups. Intense inflammation produced by IOC and subsequent tissue restructuring with intense collagen production, a characteristic not observed for TAT NAN, was noted in this approach. This data may reinforce that OC has pro-inflammatory and inflammation-modulating activities in *peeling*, but a method of application allowing OC penetration into the skin is necessary. In approach 4, possible substitutes for phenol, AG (OC with AG) and ATA (OC with ATA), were proposed. The group treated with ATA showed better results than the group after application of the formula with AG. Finally, in approach 5, the action of FH on dark-haired pigs was evaluated, showing a significant reduction in melanin compared to C-, suggesting that FH is not recommended for Fitzpatrick skin types IV-VI due to causing hypopigmentation. Overall, there has been significant advancement in scientific knowledge about the function of OC in peels, demonstrating that the chemical compounds present in the plant matrix composing the formulation are responsible for the pro-inflammatory function and promotion of collagen production. However, their mechanisms should be evaluated, and the search for new, safer, and more stable formulas should continue.

**Keywords:** Peeling, Trichloroacetic acid, Glycolic acid, Collagen

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características anatômicas da pele .....	21
Figura 2 - Exemplificação da epiderme e suas camadas .....	22
Figura 3 - Morfologia do folículo pilossebáceo .....	24
Figura 4 - Glândula sebácea anexada em um folículo piloso .....	25
Figura 5 - Fases da hemostasia .....	26
Figura 6 - Migração dos neutrófilos dos vasos sanguíneos para o tecido lesionado.	27
Figura 7 - Exemplificação das fases da remodelação tecidual pós-lesão .....	30
Figura 8 - Diferença na disposição das fibras de colágeno da matriz extracelular na derme .....	32
Figura 9 - Remodelação tecidual após o peeling com a fórmula de Hetter very heavy .....	40
Figura 10 - Comparação entre as fórmulas de Hetter very heavy com diferentes tensoativos 24 horas após a homogeneização .....	40
Figura 11 - Espécie <i>Croton tiglium</i> L .....	43
Figura 12 - Desenho experimental da pesquisa .....	45
Figura 13 - Demarcações realizadas no modelo in vivo para aplicação das amostras .....	48
Figura 14 - Método utilizado para medir a espessura do epitélio das amostras analisadas .....	49
Figura 15 - Método de quantificação dos elementos dérmicos analisados .....	49
Figura 16 - Quantificação da quantidade de colágeno tipo I ou tipo III pelo software Image J®.....	50
Figura 17 - Quantificação de melanina pelo software Image J® .....	50
Figura 18 - Microfotografias das amostras da Abordagem 1 após 1 dia da aplicação .....	54
Figura 19 - Microfotografias relacionadas as amostras da Abordagem 1 após 7 dias da aplicação .....	55
Figura 20 - Microfotografias das amostras da Abordagem 1 após 21 dias da aplicação .....	56
Figura 21 - Microfotografias obtidas após coloração por Picrosírius red nas amostras da Abordagem 1.....	58

Figura 22 - Microfotografias das amostras da Abordagem 2 após 1 dia da aplicação .....	61
Figura 23 - Microfotografias das amostras 2 e 6 que mostram infiltrado inflamatório	62
Figura 24 - Microfotografias do 7º dia de biópsia após a aplicação das amostras da Abordagem 2.....	63
Figura 25 - Microfotografias do 21º dia após a aplicação das amostras da Abordagem 2.....	64
Figura 26 - Diferenciação de colágeno tipo I e tipo III através da coloração de Picrosirius Red das amostras das Abordagem 2 .....	66
Figura 27 - Microfotografias das amostras da abordagem 3 referente ao 1º dia após aplicação.....	68
Figura 28 - Fotos das amostras da Abordagem 3 após 7 dias da aplicação .....	70
Figura 29 - Microfotografias correspondentes as amostras da Abordagem 3 após 21 dias da aplicação .....	71
Figura 30 - Imagens obtidas a partir da coloração de Picrosirius Red nas biópsias após a aplicação das amostras da Abordagem 3 .....	72
Figura 31 - Resultado da avaliação da presença de colágeno tipo III para a formulação contendo ácido tricloroacético (ATA) e ácido glicólico (AG) .....	76
Figura 32 - Microfotografias obtidas após o tecido ser corado pela técnica de Fontana Masson .....	77

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Espessura da epiderme das amostras da Abordagem 1 .....	52
Gráfico 2 - Contagem dos elementos teciduais das amostras da Abordagem 1 .....	53
Gráfico 3 - Diferenciação entre células dos tecidos analisados (Abordagem 1).....	54
Gráfico 4 - Resultado da quantidade de colágeno produzida após a aplicação (Abordagem 1) .....	57
Gráfico 5 - Comparação entre as espessuras do epitélio referente as fórmulas da Abordagem 2.....	60
Gráfico 6 - Comparativo entre as fórmulas das Abordagem 2 quanto aos elementos teciduais (Coloração Hematoxilina e Eosina).....	60
Gráfico 7 - Contagem de fibroblastos e leucócitos nos diferentes dias estudados na Abordagem 2.....	62
Gráfico 8 - Resultado da diferenciação de colágeno tipo I e tipo III para as amostras da Abordagem 2.....	65
Gráfico 9 - Comparativo entre as espessuras da epiderme determinada nas amostras da Abordagem 3.....	67
Gráfico 10 - Análise quanto a contagem dos elementos teciduais através da coloração HE para as amostras da Abordagem 3.....	69
Gráfico 11 - Quantificação de células para as amostras avaliadas na Abordagem 3	69
Gráfico 12 - Resultado da análise da coloração Picrosirius Red para as amostras da Abordagem 3.....	73
Gráfico 13 - Resultados da avaliação através da coloração de Picrosirius Red para as formulações contendo ácido glicólico e ácido tricloroacético .....	74
Gráfico 14 - Resultado da quantidade de melanina nas amostras da Abordagem 5.	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo entre as fórmulas de Baker e Gordon e fórmula de Hetter com suas indicações .....	36
Tabela 2 - Fórmulas definidas para a Abordagem 1 – Avaliação do efeito peeling da fórmula contendo a solução estoque após armazenada por 3 meses .....	44
Tabela 3 - Fórmulas para a Abordagem 2 - Comparação entre Fórmula de Hetter very heavy e a fórmula contendo fenol sem óleo de Cróton .....	44
Tabela 4 - Amostras para a Abordagem 3 – Avaliação dos efeitos dermatológicos do óleo de Cróton por meio da aplicação intradérmica .....	45
Tabela 5 - Fórmulas para a Abordagem 4 – Comparação entre a fórmula de Hetter e fórmulas contendo ácido tricloroacético e ácido glicólico .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
ACA	Alfa-cetoácidos
AG	Ácido Glicólico
AHA	Alfa-hidroxiácidos
ATA	Ácido tricloroacético
BG	Baker e Gordon
BHA	Beta-hidroxiácidos
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CFF	Conselho Federal de Farmácia
DO	Dorso
FEG	Fibro edema gelóide
FH	Fórmula de Hetter
FH3	Fórmula de Hetter de 3 meses
FM	Fontana Masson
FP	Folículo Piloso
GS	Glândula Sebácea
HE	Hematoxilina e Eosina
IOC	Intradérmico com Óleo de Cróton
LD	Lado direito
LE	Lado esquerdo
MMP	Metaloproteinases
NET	<i>Neutrophils Extracellular Traps</i>
OC	Óleo de Croton
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
SE	Solução Estoque
SF	Sem fenol
SO	Sem Óleo de Croton
TAT NAN	Tatuagem com Nanquim
TGF- $\alpha$	Fator de crescimento alfa
TGF- $\beta$	Fator de crescimento beta
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 GERAL .....	18
2.2 ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DA PELE.....	19
3.2 O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL.....	24
3.3 O PROCESSO DO ENVELHECIMENTO.....	29
3.3.1 Alteração na matriz extracelular dérmica .....	30
3.3.2 Alterações na permeabilidade e proteção cutânea .....	31
3.3.3 Ativação de metaloproteinases (MMP).....	31
3.3.4 Redução da angiogênese.....	31
3.3.5 Hipotrofia das glândulas sebáceas.....	32
3.3.6 Alteração na atividade imunológica da pele .....	32
3.4 TÉCNICAS ESTÉTICAS PARA TRATAMENTOS ANTIAGE .....	32
3.4.1 Peelings.....	34
3.4.2 Formulações de fenol associadas ao óleo de Cróton.....	36
3.5 PRODUTOS NATURAIS COM PROPRIEDADES ESTÉTICAS .....	39
3.6 ÓLEO DE CRÓTON E SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL .....	43
4.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES .....	43
4.3 EXPERIMENTO IN VIVO .....	45
4.4 AVALIAÇÃO UTILIZANDO A COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA (HE).....	47
4.5 AVALIAÇÃO UTILIZANDO A COLORAÇÃO PICROSIRIUS RED .....	48
4.6 AVALIAÇÃO USANDO A COLORAÇÃO FONTANA MASSON .....	48
4.7 ESTATÍSTICA .....	49
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
5.1 ABORDAGEM 1 – AVALIAÇÃO DO EFEITO PEELING DA FÓRMULA CONTENDO A SOLUÇÃO ESTOQUE APÓS ARMAZENAMENTO POR 3 MESES.....	50
5.2 ABORDAGEM 2 – COMPARAÇÃO ENTRE FÓRMULA DE HETTER VERY HEAVY E A FÓRMULA CONTENDO FENOL SEM ÓLEO DE CRÓTON (OC).....	57

5.3 ABORDAGEM 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DERMATOLÓGICOS DO ÓLEO DE CRÓTON (OC) POR MEIO DA APLICAÇÃO INTRADÉRMICA.....	65
5.4 ABORDAGEM 4 – COMPARAÇÃO ENTRE A FÓRMULA DE HETTER E FÓRMULAS CONTENDO ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (ATA) E ÁCIDO GLICÓLICO (AG).....	72
5.5 ABORDAGEM 5 – ANÁLISE DO EFEITO DO PEELING COM A FÓRMULA DE HETTER EM ANIMAIS DE PELAGEM ESCURA.....	75
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.....</b>	<b>88</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Entre os procedimentos mais procurados pela população, destacam-se aqueles que visam combater o envelhecimento, tais como o *peeling* químico. Este procedimento promove uma intensa descamação da pele, favorecendo a melhoria na aparência ao propiciar o clareamento de melasmas, a redução de rugas finas, o fechamento de poros, entre outros benefícios (Leite, 2021).

Existem diversos protocolos bem estabelecidos para a realização de *peeling*, tais como o peeling de Jessner, o peeling de Hetter, e a utilização de ácidos específicos como o ácido tricloroacético (ATA), o ácido glicólico (AG), o ácido salicílico, entre outros. A escolha do tratamento dependerá da avaliação profissional conforme as necessidades individuais do paciente, uma vez que cada tipo de *peeling*, dependendo dos ativos utilizados, pode gerar efeitos que variam de superficiais a profundos (Yokomizo *et al.*, 2013; Oliveira; Pereira; Cerri, 2021).

Na área da estética, os produtos naturais são amplamente empregados para auxiliar no emagrecimento, tratamento do Fibro Edema Geloide (FEG), rejuvenescimento, entre outros propósitos. Contudo, a maior dificuldade encontrada na utilização desses produtos reside na falta de comprovação científica quanto à dose ideal para alcançar resultados satisfatórios, bem como na determinação da composição química da matriz, a fim de qualificar e quantificar os marcadores químicos responsáveis pela atividade desejada (Gervásio, 2021).

Como exemplo destacam-se as fórmulas de Hetter e de Baker e Gordon que combinam o fenol com óleo de Cróton (OC) e que são utilizadas para *peelings* na área estética e dermatológica.

O primeiro documento científico contendo uma mistura de fenol com OC foi descrito pelo cirurgião plástico de Hollywood, Dr. Adolf Brown, em sua patente sobre misturas de óleos vegetais com fenol para rejuvenescimento cutâneo (Brown, 1959). O Dr. Adolf Brown juntamente com sua esposa, Dra. Marthe Brown, descreveram histologicamente os resultados das fórmulas “saponificadas” de fenol, mas não descreveram suas fórmulas detalhadamente (Brown, 1959).

Os pesquisadores Baker e Gordon, cirurgiões plásticos de Miami, foram os pioneiros a publicar uma fórmula contendo OC em um *peeling* de fenol na área médica, demonstrando resultados melhores do que aqueles observados apenas com o uso do fenol. A partir dessa observação, e pela simplicidade da fórmula de Baker e

Gordon, essa fórmula se difundiu amplamente, sendo que muitos dermatologistas e cirurgiões plásticos a utilizam para tratamentos estéticos da face com a finalidade de rejuvenescimento (Baker, 1962).

A partir dos conhecimentos dermatológicos que esta fórmula proporcionava, Hetter em 2000 começou a estudar mais profundamente variações na concentração do OC na fórmula, e observou que quanto maior a concentração do óleo na preparação, mais intenso era o resultado. Esse estudo além de revelar a grande importância do ativo promoveu a possibilidade de avaliação da formulação em diferentes regiões da face (fórmulas que continham menores concentrações seriam indicadas para regiões mais sensíveis e finas, e as fórmulas com maiores concentrações seriam aplicadas em regiões mais espessas) (Hetter, 2000a; Hetter, 2000b; Hetter, 2000c; Hetter, 2000d).

O maior desafio na aplicação dos *peelings* contendo fenol, é a toxicidade desse composto, na prática clínica muitos pacientes apresentam arritmia durante o procedimento. Pesquisas clínicas justificam que o fenol é absorvido rapidamente chegando à corrente sanguínea e a muitos órgãos como o rim e o coração. O médico deve avaliar cuidadosamente se o paciente pode seguir com o procedimento (Kadunc; Vanti, 2009).

Até poucos anos atrás, o OC era tratado, pela comunidade científica e médica, apenas como um coadjuvante farmacotécnico, auxiliando na estabilidade e na permeação do fenol na pele; porém em estudos recentes o OC adquiriu um outro *status*, e passou a ser considerado potente agente *antiage* que apresenta função importante nas fórmulas de *peeling* presentes na prática estética (Justo, 2019).

O OC possui em sua composição química o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), um éster de forbol, que atua na ativação da cascata de inflamação do ácido araquidônico, regulando muitas proteínas causadoras de inflamação. Portanto o OC tem grande importância em fórmulas de *peeling*, possivelmente contribuindo para a ampliação desses efeitos (Horinouchi *et al.*, 2013; Kennedy, 1995; Silva *et al.*, 2021).

O OC é extraído da espécie *Croton tiglium* L. que pertence à família Euphorbiaceae, o nome popular da espécie é jepala, e é nativa das regiões tropicais da Índia; é uma espécie que pode atingir aproximadamente 6 metros de altura e o óleo é extraído da semente, chamada popularmente na Índia como amagota, a extração é

feita por prensagem a frio e tem efeito purgativo no intestino se ingerido (Kaur; Garg, 2019; Meena *et al.*, 2021).

Em pesquisas científicas o OC é usado para promover a inflamação em orelha de animais de laboratório, método denominado como modelo de edema de orelha. A técnica foi padronizada por Tubaro *et al.* (1986) e como protocolo é adicionado 0,4 mg de OC em 20  $\mu$ L de acetona, a solução é aplicada topicamente na orelha de camundongos, esse efeito pró-inflamatório tem grande potencial para justificar o emprego em *peelings*, visto que o processo inflamatório favorece a ativação de fibroblastos para a produção de colágeno.

Analisando os resultados apresentados na literatura científica, nota-se a necessidade de realizar pesquisas na área dermatológica/estética para validar as indicações do óleo da espécie *C. tiglium* em fórmulas de *peeling*, uma vez que existem poucos estudos disponíveis. Além disso, surge a necessidade de encontrar alternativas ao fenol.

Este estudo em questão propõe a avaliação do OC para ação de *peeling* em sua forma *in natura* e quando incorporado a outras substâncias. O objetivo é justificar a inclusão do OC nesse tipo de procedimento, bem como buscar formulações que apresentem um perfil de segurança aprimorado em comparação ao fenol. Além disso, buscou-se analisar o impacto do tempo de armazenamento e da via de aplicação (tópica e intradérmica) sobre o efeito do *peeling* com OC.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a ação dermatológica no modelo *in vivo* quanto ao processo inflamatório e estímulo de produção de colágeno das amostras contendo o OC e propor novas formulações para aplicação de *peeling*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- a) Avaliação das amostras contendo OC na formulação em modelo suíno de pelagem clara e pelagem escura para avaliação macroscópica e microscópica;
- b) Avaliar os efeitos dermatológicos após armazenamento da solução estoque por 3 meses;
- c) Identificar se o armazenamento interfere na ação biológica ao avaliar os efeitos dermatológicos;
- d) Avaliar a ação das diferentes formas de aplicação do OC, pela via tópica ou intradérmica;
- e) Associar o OC ao ATA e AG e propor substituição ao fenol;
- f) Comparar os efeitos biológicos de formulação contendo apenas fenol ou apenas OC com a formulação de Hetter;
- g) Determinar se o *peeling* com formulação de Hetter reduz a quantidade de melanina em animais de pelagem escura.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DA PELE

A pele é formada por epiderme, derme e a hipoderme é o tecido subcutâneo abaixo da pele (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa e é subdividida em camada basal, espinhosa, granulosa e córnea formando o sistema ceratinocítico que tem a função de dispor as células epiteliais justapostas e que implica na renovação celular constante. A multiplicação dos queratinócito na camada basal, favorecem a diferenciação e a migração para camadas mais externas, como exemplificado na Figura 2 (Belda Junior; Chiacchio; Criado, 2014).

Figura 1 - Características anatômicas da pele

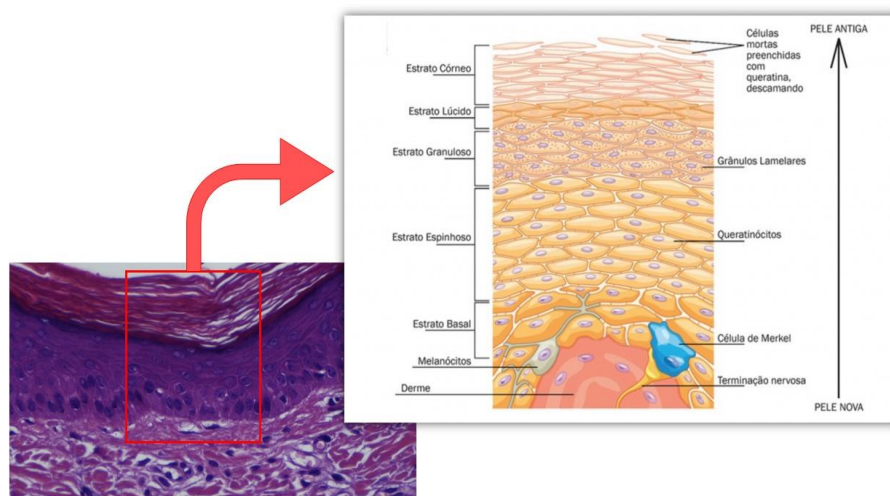


Fonte: A autora

Nota: Coloração de Fontana Masson, ampliação de 20X.

A camada basal está na parte interna da epiderme, formada por uma fileira de queratinócitos, também chamados de ceratinócitos, células responsáveis pela produção de queratina. O queratinócito apresenta a forma colunar, seu citoplasma é basófilo e possui um núcleo grande e oval. Na camada basal também se observa células-tronco que se dividem lentamente dando origem aos queratinócitos capazes de se dividir rapidamente. Após a mitose, os queratinócitos migram para a camada seguinte e perdem a capacidade de divisão celular, podendo se diferenciar (Azulay, 2015).

Figura 2 - Exemplificação da epiderme e suas camadas



Fonte: Microfotografia – A autora / Imagem extraída de Histologia Interativa da Unifal, adaptada pela autora. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/pele-e-anexos/>. Acesso em: 31 jan. 2022.

Nota: Coloração de HE, ampliação de 100X.

Quando o queratinócito transita para a camada espinhosa, também chamada de camada de Malpighi, eles se tornaram mais achatados e o seu citoplasma fica mais ácido. Ao contrário da camada basal, a camada espinhosa possui várias fileiras, a quantidade varia conforme a região do corpo humano. Para o queratinócito transitar pela camada de Malpighi pode levar aproximadamente 34 dias. Uma característica importante dessa região é a presença em grande quantidade de desmossomos que tem a função de manter as células interligadas. Outro componente importante é a presença do glicocálice que além de ajudar na adesão celular, facilita a circulação de nutrientes e água (Belda Junior; Chiacchio; Criado, 2014).

Entre a camada basal e a granulosa pode-se encontrar células de Langerhans, responsáveis por atividades imunológicas, fazendo o reconhecimento, internalização, processamento e apresentação do antígeno ao linfócito T (Azulay, 2015). Em seguida os queratinócitos irão para a camada granulosa, que possui esse nome pois as células apresentam grânulos basofílicos de cerato-hialina composta por pró-filagrina, citoqueratina e loricrina aumentando a adesão e a compactação dos filamentos de queratina. Essa camada é formada por poucas fileiras de células que estão em uma intensa fase de metabolismo, preparando-se para migrar para a camada córnea, formando os corneócitos. Durante o processo de metabolismo e por ação de hidrolases, os lipídios presentes nos grânulos lamelares são transformados em ceramidas, ácidos graxos, colesterol, triglicerídeos, impermeabilizando o tecido (Azulay, 2015; Van de Graaff, 2003).

Por ação de muitos acontecimentos simultâneos que acontecem na camada granulosa, é formada a camada córnea, entre eles destaca-se a apoptose que destrói os núcleos e organelas das células. A formação de substâncias apolares e organização dos filamentos de queratina e com a ação das transglutaminases são formados os corneócitos que são planos e acidófilos. Outro evento importante é degradação gradual de desmossomos facilitando a descamação sem lesionar o tecido (Belda Junior; Chiacchio; Criado, 2014; Goodman; Gilman, 2012).

Nas camadas mais internas da pele, abaixo da epiderme, está a derme que se conecta com a epiderme pela junção dermoepidérmica. A primeira camada da derme é denominada papilar ou superficial, essa parte é formada por finas fibras de colágeno dispostas verticalmente, também há grande quantidade de células como fibroblastos e células do sistema imunológico (Sampaio; Rivitti, 2007). Posterior a camada papilar, está a camada reticular, que é formada por fibras de colágeno mais espessa e dispostas na horizontal. A camada adventícia envolve vasos sanguíneos e anexos cutâneos (Azulay, 2015; Sampaio; Rivitti, 2007; Van de Graaff, 2003).

No geral a derme é formada por diferentes células como fibroblastos, mastócitos, macrófagos, dendrócitos, substância fundamental, vasos sanguíneos e linfáticos e inervações (Ross; Pawlina, 2012). A substância fundamental formada por proteoglicanos capazes de interligar os componentes da derme, por possuírem um eixo proteico, os glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, sulfato de condroitina *etc.*), por sua vez, se ligam nos proteoglicanos (Venus; Waterman; McNab, 2011).

Os vasos sanguíneos presentes na derme são responsáveis pela regulação da homeostasia, temperatura e oxigenação do tecido. Auxilia na cicatrização e eventos imunológicos. Os vasos linfáticos têm a função de reabsorver o fluido intersticial e moléculas grandes como proteínas (Ross; Pawlina, 2012; Venus; Waterman; McNab, 2011). As terminações nervosas estão amplamente distribuídas na pele e funcionam como sensores para reagir a diferentes estímulos que acontecem no ambiente, mas além das terminações sensoriais, há terminações simpáticas autônomas que comandam funções importantes como o funcionamento das glândulas, vasoconstrição ou vasodilatação e o músculo eretor do pelo (Azulay, 2015; Ross; Pawlina, 2012; Venus; Waterman; McNab, 2011).

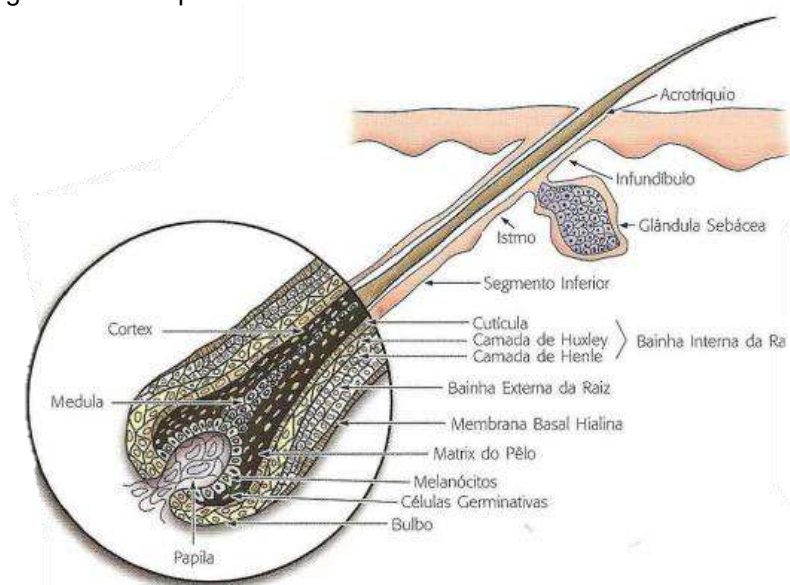
A hipoderme é a camada subcutânea, repleta de células adiposas que armazenam a gordura absorvida de diferentes fontes alimentares. Septos de colágeno, vasos sanguíneos e linfáticos e inervações delimitam as células. O

armazenamento de gordura varia conforme as regiões do corpo, sendo a hipoderme mais espessa na região das nádegas e na região abdominal, e conforme o metabolismo do corpo humano, cada indivíduo pode acumular maior quantidade de gordura em locais específicos. A hipoderme apresenta a função de proteção contra impactos, reserva energética e isolante térmico (Van de Graaff, 2003; Venus; Waterman; Mcnab, 2011).

Os anexos cutâneos são folículos pilossebáceos, glândulas apócrinas e sudoríparas e as unhas. As glândulas sudoríparas estão localizadas parte na derme e outra parte na epiderme, responsável pela produção de suor para regulação da temperatura. Essas glândulas possuem um ducto com células mioepiteliais que ao serem estimuladas pela acetilcolina promovem a sudorese (Azulay, 2015).

As glândulas apócrinas estão presentes em regiões específicas (genitais, axilas e periareolar nas mamas). A porção de secreção das glândulas fica entre a derme e a hipoderme, são glândulas que são ativadas na puberdade sob ação dos hormônios andrógenos. A secreção dessa glândula é rica em compostos orgânicos que são degradados por bactérias da flora normal (Tagliolatto; Enokihara; Alchorne, 2011). Quanto ao folículo pilossebáceo é composto pelo folículo piloso, glândulas sebáceas e músculo eretor. O bulbo do pelo está presente no fim do folículo e é constituído pela derme recoberto por células da epiderme, está presente em fases de crescimento do pelo (Figura 3) (Sampaio; Rivitti, 2007).

Figura 3 - Morfologia do folículo pilossebáceo

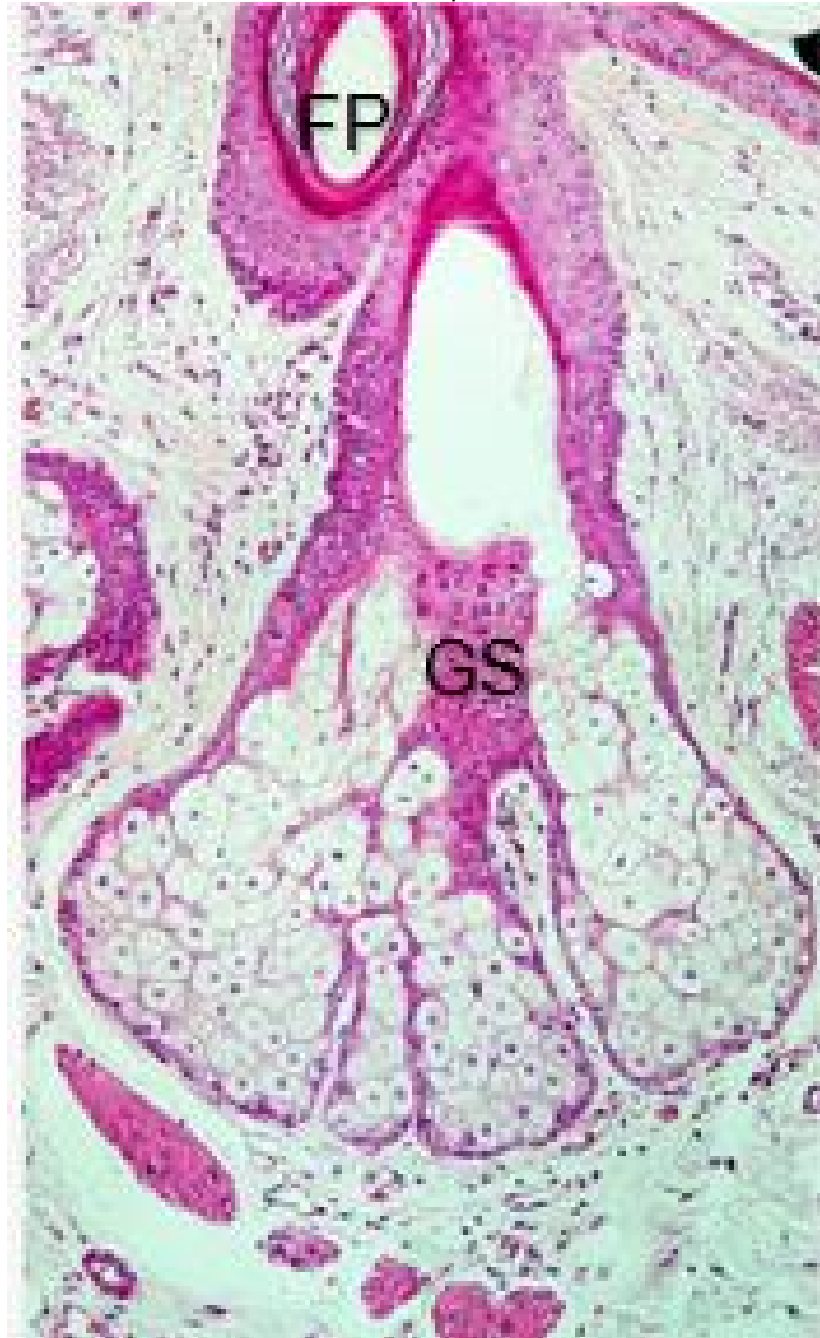


Fonte: Sampaio e Rivitti (2007)



As glândulas sebáceas (Figura 4) estão geralmente ligadas ao folículo piloso, lançando suas secreções, porém em algumas regiões sua abertura é localizada na epiderme. Essas glândulas entram em intensa atividade na puberdade, produzindo o sebo responsável por lubrificar e hidratar a pele, porém em alguns casos podem gerar a acne (Tagliolatto; Enokihara; Alchorne, 2011).

Figura 4 - Glândula sebácea anexada em um folículo piloso



Fonte: Adaptado de histologia Interativa da USP Disponível em: <https://mol.icb.usp.br/index.php/15-14-pele/>. Acesso em: 03 fev. 2021.

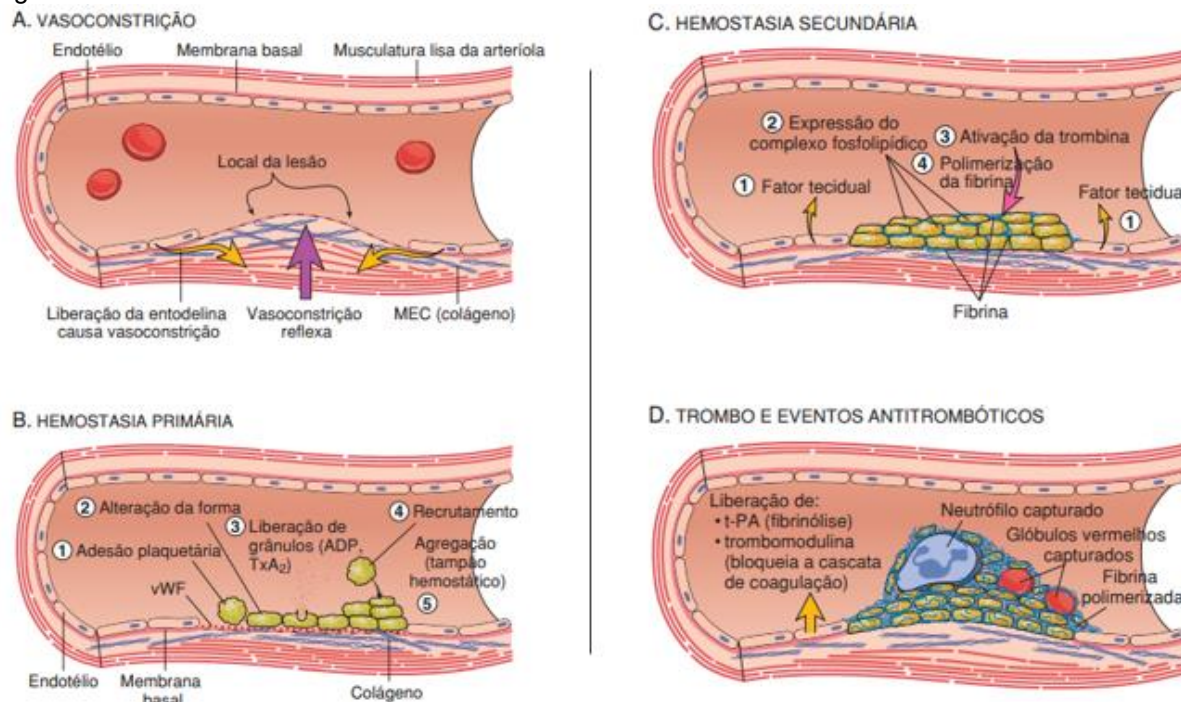
Nota: Coloração HE, ampliação de 100 X. GS – Glândula sebácea e FP – Folículo piloso.

### 3.2 O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

O processo de cicatrização é complexo porque envolve não apenas fatores de crescimento e células inflamatórias, mas o tecido como um todo. As fases da cicatrização podem ser divididas em quatro: hemostasia, inflamação, formação do tecido e remodelação da ferida (Azulay, 2015).

Quando ocorre alguma lesão tecidual levando ao rompimento de vasos sanguíneos, inicia a hemostasia, a primeira fase. Inicialmente a ação das plaquetas são de suma importância para a formação de coágulo e a recuperação da homeostase. As plaquetas irão se agregar e liberar mediadores e fatores para a formação de coágulo formando o tampão hemostático primário (Figura 5).

Figura 5 - Fases da hemostasia



Fonte: Kumar *et al.* (2010)

Nota: A. Vasoconstrição: os fatores locais promovem uma vasoconstrição breve. B. Receptores da glicoproteína Ib (GpIb) são expressos que favorecem a adesão das plaquetas, ao serem ativadas, mudam sua forma e liberam ADP (Adenosina) e TxA<sub>2</sub> (Tromboxano A<sub>2</sub>) que aumentam a agregação plaquetária e formam o tampão hemostático primário. C. No local, após a formação da cascata de coagulação, resulta na polimerização da fibrina e formam o tampão hemostático secundário. D. A liberação de alguns fatores regula o processo hemostático no local, clivam a fibrina e reduzem a formação do trombo.

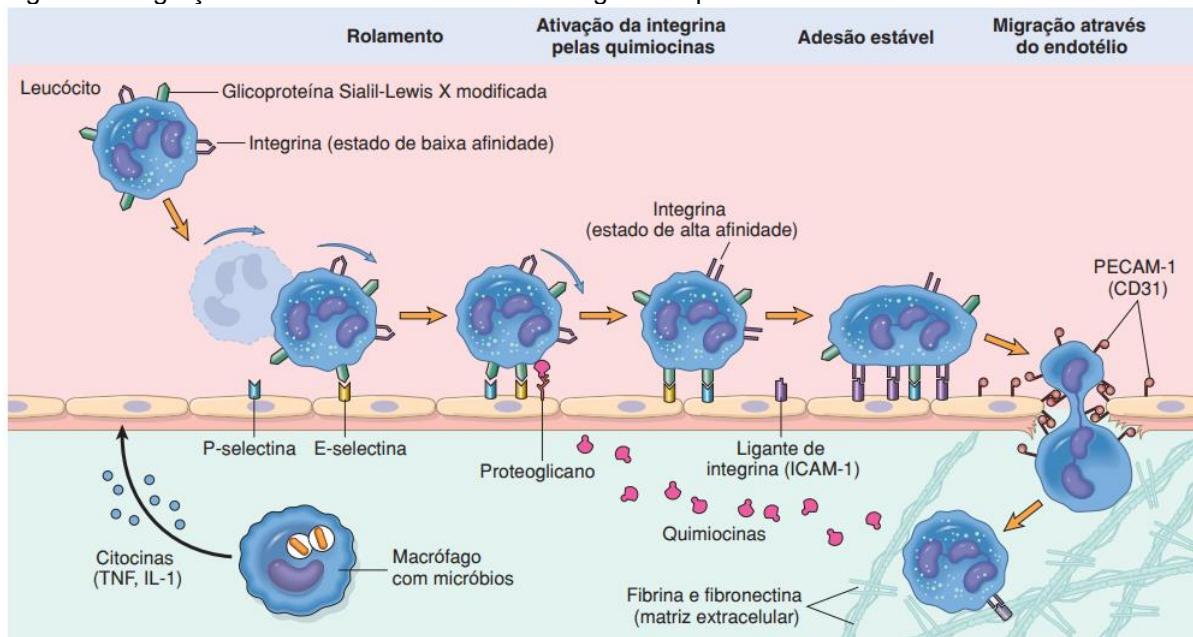
Na hemostasia secundária o fibrinogênio liberado é transformado em fibrina formando a rede de fibrina e assim aumenta a agregação plaquetária e formam o tampão hemostático secundário definitivo. Para o início do reparo tecidual as

plaquetas também liberam PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (fatores de crescimento alfa e beta) (Kumar *et al.*, 2010).

A fase inflamatória pode ser classificada como aguda ou crônica. Na inflamação aguda há predominância de neutrófilos e a duração do processo pode levar algumas horas, a recuperação é rápida. Se a resposta inflamatória aguda não é suficiente, a inflamação evolui para crônica, que apresenta maior quantidade de macrófagos e linfócitos, o processo tem duração de alguns dias a semanas, a recuperação é lenta, nesse caso, o desfecho clínico pode gerar fibrose e destruição tecidual (Kumar *et al.*, 2010).

A fase da inflamação só termina após a eliminação completa dos agentes agressores e das células lesionadas. Para que o processo inflamatório ocorra, uma série de eventos são necessários: mudanças estruturais na microcirculação e emigração dos leucócitos. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular facilitam o efluxo de proteínas plasmáticas e células do interior dos vasos sanguíneos para o tecido injuriado (Figura 6).

Figura 6 - Migração dos neutrófilos dos vasos sanguíneos para o tecido lesionado



Fonte: Kumar *et al.* (2010)

Enquanto os leucócitos ainda estão nos vasos sanguíneos, eles fazem o processo de marginação, rolamento, e adesão no endotélio. Em estado normal o endotélio não está ativado, portanto, não permite a adesão das células leucocitárias. Porém, em um processo inflamatório, o endotélio expressa P-selectina, E-selectina,

GlyCAM-1, CD34, ICAM-1 e VCAM-1, moléculas que se conectam nas integrinas e glicoproteínas dos leucócitos que favorecem os processos descritos anteriormente para a migração das células inflamatórias.

Após a migração, os leucócitos fazem a quimiotaxia até o tecido agredido, mecanismo acionado por fatores gerados por células lesionadas, cascata da coagulação e pelo PDGF que também irá estimular a proliferação de células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais (Wynn; Vannella, 2016).

Ao chegar no local os neutrófilos fazem a fagocitose através da expressão de receptores para o reconhecimento de antígeno, conforme os agentes agressores e tecido morto é eliminado, as células inflamatórias, os mediadores inflamatórios têm meia-vida curta e os neutrófilos não vivem por mais de 24 horas após a saída do vaso sanguíneo, o sistema de apoptose é ativado e os neutrófilos restantes são fagocitados por macrófagos (Kumar *et al.*, 2010; Wynn; Vannella, 2016).

A inflamação crônica ocorre quando o tecido está exposto constantemente ao agente agressor, infecção persistente e doenças autoimunes. Apresenta como principal característica a presença de células mononucleares (Kumar *et al.*, 2010).

Os macrófagos estão presentes na fase aguda e permanecem ativos na fase crônica da inflamação por causa do recrutamento constante, sendo predominante após 48 horas, são responsáveis por liberar mediadores da inflamação, porém seus produtos são tóxicos para os agentes agressores e para o próprio tecido, entre seus produtos estão as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, proteases e quimiocinas (Kumar *et al.*, 2010; Wynn; Vannella, 2016).

Na inflamação crônica os linfócitos também são importantes, os macrófagos apresentam os antígenos aos linfócitos T ativados que produzem mais citocinas e aumentam a migração de monócitos ao local.

Os macrófagos secretam fatores de crescimento para os fibroblastos, portanto são importantes para marcar o processo de transição entre a fase inflamatória e a fase de reparação (Azulay, 2015; Wynn; Vannella, 2016).

No processo de reparo tecidual, logo que ocorre a lesão, horas posteriores, os queratinócitos se movem, para isso algumas características se modificam, como retração das células, dissolução dos desmossomos, perda da interação entre a derme e epiderme. A migração dos queratinócitos ocorre para fazer divisão entre o tecido lesado e o viável. Pelo fato do queratinócito não expressar receptores para fibrina e

fibrinogênio, ele irá migrar acima do colágeno tipo I que resulta na formação e remoção da crosta de células mortas (Azulay, 2015; Kumar *et al.*, 2010).

Simultaneamente, proteínas da membrana basal se movem da margem da ferida para o centro, fixando as células epiteliais em sua morfologia normal na membrana basal por hemidesmosomos e a nova derme por fibras de colágeno tipo VII (Litjens; Pereda; Sonnenberg, 2006).

Após 4 dias da lesão ocorre a angiogênese, que é estimulada por diversos fatores (mediadores para quimiotaxia, estímulo da mitose etc.) formando o chamado tecido de granulação, que recebe esse nome por suas características: rede de vasos sanguíneos novos e células inflamatórias que proporcionam o aspecto granular. Com os mediadores liberados na fase inflamatória, especialmente o TGF- $\beta$ , ocorre o estímulo e a migração de fibroblastos para o local, e a consequente formação de colágeno. A ação de metaloproteinases de matriz também facilitam a migração dos fibroblastos (Gabbiani *et al.*, 1972; Ryan *et al.*, 1974).

Ainda com a migração, fibroblastos e macrófagos produzem uma nova matriz extracelular rica em ácido hialurônico e fibronectina, substituindo o coágulo de fibrina. Posteriormente um novo conteúdo é depositado, que é o colágeno tipo III, um colágeno mais jovem e pouco resistente, que será substituído por colágeno tipo I, mais resistente e maduro (Asgari *et al.*, 2017; Davis *et al.*, 2020).

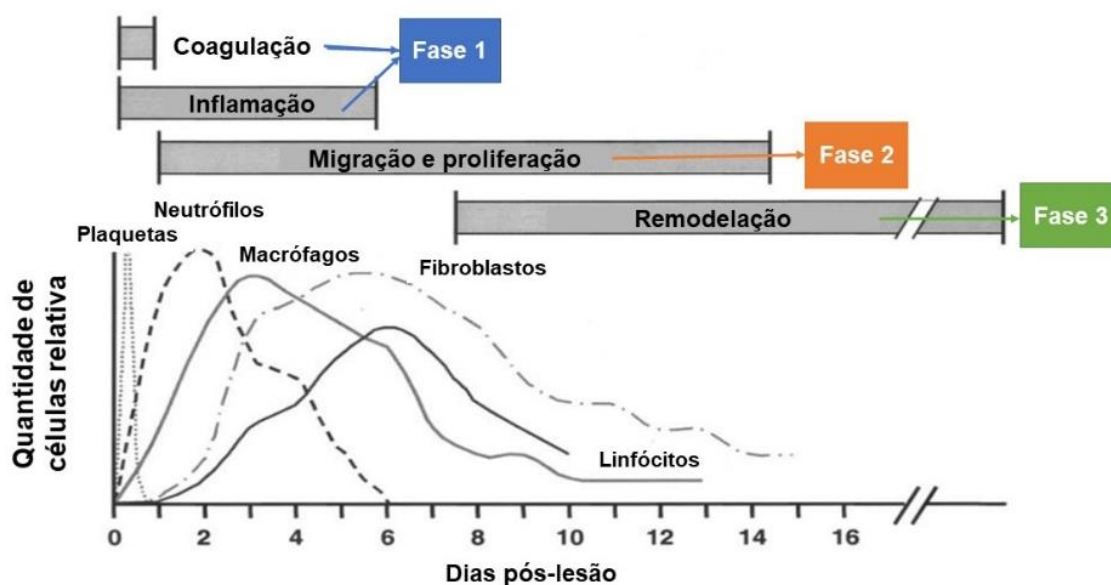
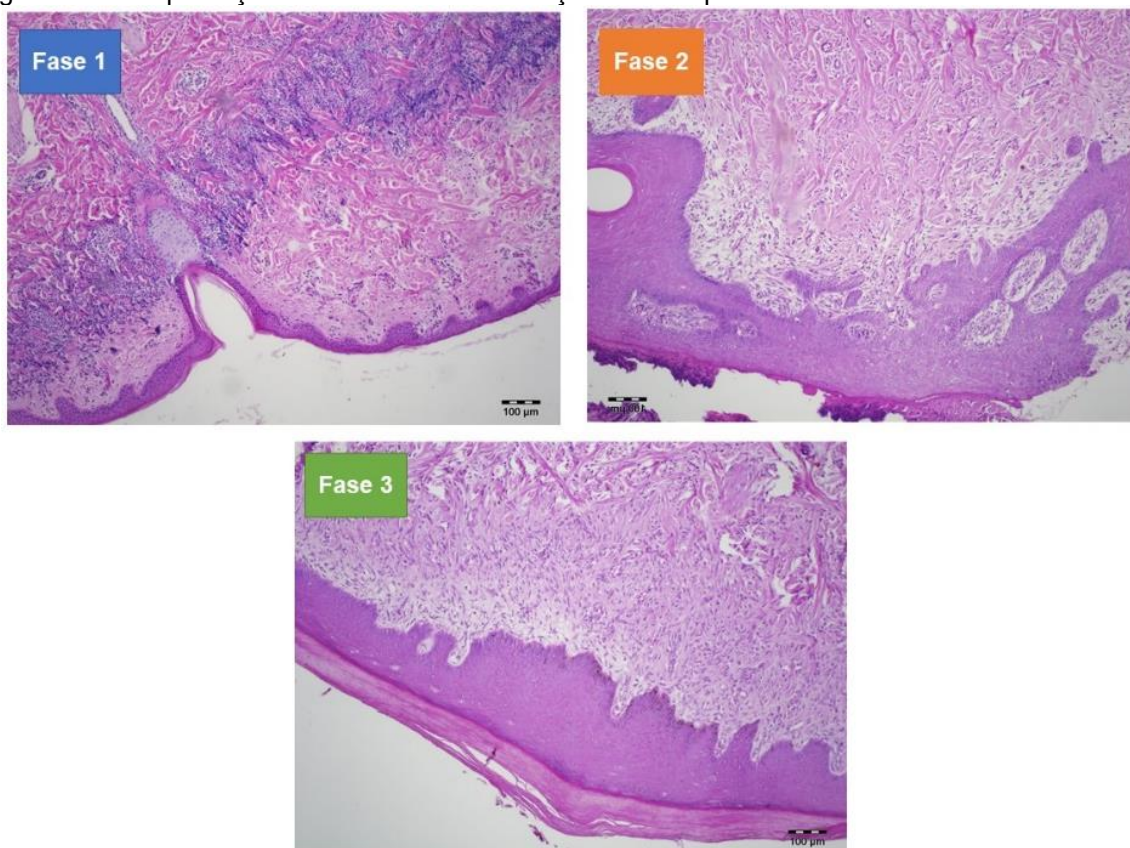
Conforme ocorrem as modificações na matriz, os fibroblastos reduzem a sua atividade, fenotipicamente remodelam e realizam a contração da ferida, pois se modificam em miofibroblastos. A interação que ocorre através de integrinas e as ligações cruzadas de colágeno com essas células, influenciam muito a força de tração do tecido (Azulay, 2015; Ryan *et al.*, 1974; Zeltz; Gullberg, 2016).

Entre o 10º e o 12º dia após a lesão ocorre a retração e apoptose dos fibroblastos e regressão dos capilares sanguíneos, caminhando para a fase de remodelação da ferida. Nessa fase ocorre a remodelação da matriz, fibroplasia e maturação da nova epiderme que se inicia das bordas da lesão para o centro.

Quando as lesões são grandes, enquanto ocorre a remodelação da ferida, o tecido de granulação ainda está atuante, caracterizando um aspecto diferenciado entre os tecidos, resultando em cicatrizes. Na Figura 7 exemplifica as fases do processo inflamatório e reparo tecidual (Azulay, 2015; Mendonça; Coutinho-Netto, 2009).



Figura 7 - Exemplificação das fases da remodelação tecidual pós-lesão



Fonte: Fotos de microscopia – A autora / Gráfico - Adaptado de Park e Barbul (2004).

Nota: Fotos de microscopia em ampliação de 100 X, biópsias realizadas após 1, 7 e 21 dias da aplicação da fórmula de Hetter coradas em HE. Na microfotografia da Fase 1 é possível observar claramente o infiltrado inflamatório que ocorre após 1 dia da aplicação. Na microfotografia da Fase 2 observa-se que não há uma epiderme bem definida e que tem a presença maciça de fibroblastos após 7 dias da aplicação enquanto após 21 dias da aplicação a epiderme já está mais estruturada, há presença de colágeno (fibras mais finas) indicativo de colágeno tipo III indicando a Fase 3 do reparo tecidual.

### 3.3 O PROCESSO DO ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é considerado uma etapa da vida em decorrência a um processo multifatorial que ocorre desde o nível molecular ao fisiológico e estrutural por razões das mudanças que acontecem ao longo dos anos, sejam elas sociais, psicológicas e funcionais (Saldanha, 2004).

O processo de envelhecimento pode ser classificado como intrínseco e extrínseco e há diferenças no processo em relação às modificações das características histológicas (Quadro 1). O primeiro é caracterizado pela ação cronológica, causados por danos endógenos cumulativos, eventos naturais, seja por ação de espécies reativas de oxigênio ou por particularidades genéticas de cada indivíduo, pode-se atenuar, mas é irremediável.

Quadro 1 - Diferenças histológicas entre o envelhecimento intrínseco e extrínseco

Estrutura	Envelhecimento Intrínseco	Envelhecimento Extrínseco
Epiderme	Diminuição da mitose; Redução da quantidade e da atividade de células de Langerhans; Redução do melanócitos; Redução da junção dermoepidérmica.	Redução da quantidade e da atividade de células de Langerhans; Aumento na atividade dos melanócitos; Espessamento actínico, aumento da mitose celular e redução da descamação; Achatamento da lâmina dermoepidérmica.
Derme	Redução da quantidade de fibroblastos; Redução da quantidade de fibras e colágeno e elásticas; Redução do número de células.	Redução da quantidade de fibras e colágeno e elásticas; Fibras elásticas sofrem elastose; Fibras colágenas são degradadas; Redução da quantidade de fibroblastos.
Anexos	Despigmentação e redução na quantidade dos pelos; Diminuição da microcirculação; Diminuição na produção de sebo e suor.	-

Fonte: Adaptado de Ruivo (2014)

No processo de envelhecimento extrínseco, no qual os principais agentes prejudiciais, são os raios ultravioleta, mas outros podem ser coadjuvantes no processo como o estilo de vida, tabagismo, poluição ambiental *etc.* Nesse caso evitando os fatores predisponentes para o envelhecimento, ele não irá acontecer rapidamente.

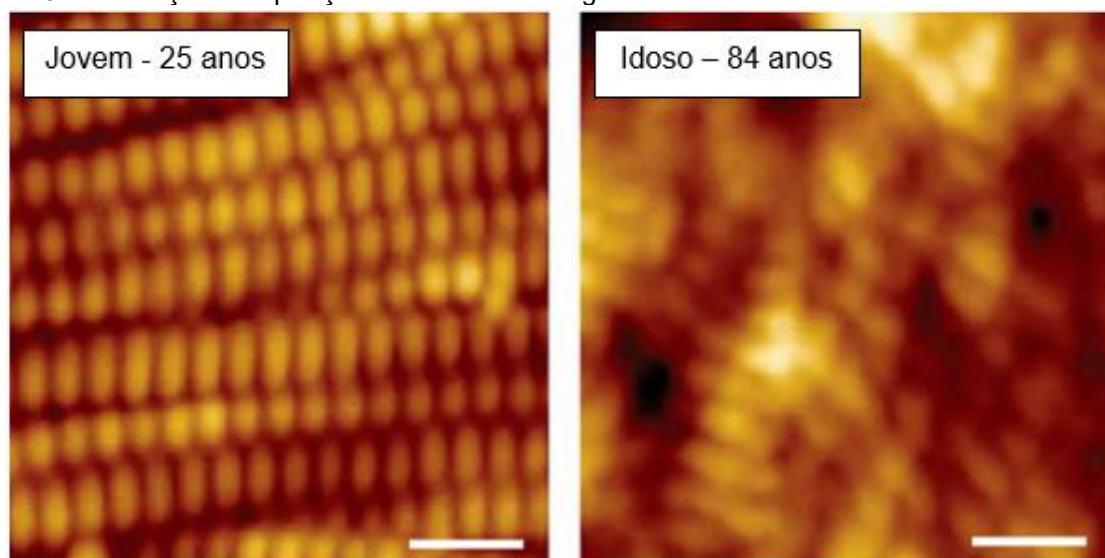
Não há uma única explicação para o envelhecimento, por esse motivo, teorias foram criadas justificando esse evento, entre elas encontra-se a teoria do encurtamento do telômero, explicando que a cada mitose ocorre a redução do telômero e a capacidade de divisão celular reduz progressivamente. Outra teoria é em relação ao reparo do DNA, se ocorrer lesões sucessivas no DNA, ele terá erros e provavelmente dificulta a capacidade de reparo (Mitra *et al.*, 2011).

Uma das teorias mais citadas é do aumento de espécies reativas de oxigênio relacionada ao envelhecimento intrínseco e extrínseco (ação dos raios UV) levando ao estresse oxidativo e prejudicando o reparo tecidual. Todas as teorias de alguma forma se complementam e causam efeitos histológicos comuns que serão citados a seguir (Farage *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2011; Quan; Fisher, 2015; Ruivo, 2014).

### 3.3.1 Alteração na matriz extracelular dérmica

Entre tantas teorias de origem do envelhecimento e seus fatores, eles irão causar alterações estruturais importantes principalmente na matriz extracelular da derme e as regiões mais afetadas e visíveis são a face, pescoço, antebraço e parte interna da perna. Na Figura 8 é possível comparar a diferença da disposição e quantidade de fibras de colágeno em um jovem de 25 anos (as fibras estão em maior quantidade, organizadas e compactadas) e um idoso de 84 anos (as fibras estão desorganizadas e dispersas) (Quan; Fisher, 2015).

Figura 8 - Diferença na disposição das fibras de colágeno da matriz extracelular na derme



Fonte: Adaptada de Quan e Fisher (2015)

Nota: Microfotografia realizada em Microscópio de Força Atômica. Escala – 100 nm.

O que relaciona a aparência envelhecida da pele com a progressão do tempo é justificada por dois mecanismos diferentes: a redução gradativa de produção de colágeno e a fragmentação por ação enzimática das fibras de colágeno existente. O aumento da fragmentação do colágeno reduz a tensão exercida também sobre o fibroblasto e essa célula quando atrofiada produz menos colágeno e mais colagenase, gerando um processo contínuo de envelhecimento dérmico (Fisher; Varani; Voorhees, 2008; Quan *et al.*, 2010).



### 3.3.2 Alterações na permeabilidade e proteção cutânea

Outras alterações também acontecem na epiderme, modificando sua estrutura e alterando a permeabilidade cutânea, assim, facilita traumas e entrada de substâncias nocivas e/ou microrganismos. A alteração da permeabilidade e proteção justifica-se pela redução de síntese do colesterol. A ação de citocinas e de hormônios são fundamentais para agravar a permeabilidade cutânea. Outro fator é a redução da capacidade de diferenciação dos queratinócitos que são fundamentais para manter a estrutura do estrato córneo (Farage *et al.*, 2008; Rizzi *et al.*, 2021).

### 3.3.3 Ativação de metaloproteinasas (MMP)

As MMP são enzimas capazes de degradar proteínas da matriz extracelular, importantes no processo de reparo tecidual, remodelando o tecido para que não forme queloides ou cicatrizes hipertróficas. No geral, já foram identificados aproximadamente 25 tipos de MMP, mas cinco estão profundamente relacionadas ao processo de envelhecimento (Quadro 2).

Quadro 2 - Metaloproteinasas envolvidas no processo de envelhecimento

MMP	Funções
MMP-1 (COLAGENASE)	Degrada fibras de colágeno em feixes
MMP-2 (GELATINASE A)	Degrada fibras individuais de colágeno
MMP-9 (GELATINASE B)	Degrada fibras elásticas
MMP-3 (ESTROMELISINA)	Degrada fibras individuais de colágeno
MMP-12 (METALOPROTEINASES DE MATRIZ)	Degrada componentes da matriz extracelular

Fonte: Adaptada de Ruivo (2014)

A ação de determinadas MMP irá aumentar a ativação de outras, por exemplo, a colagenase ao degradar feixes de colágeno proporciona a retroalimentação, ativando a estromelina e a gelatinase. Em indivíduos jovens as ações das MMP são controladas por inibidores dessas enzimas, mas com a senescência, os inibidores diminuem (Rizzi *et al.*, 2021; Vedrenne *et al.*, 2012).

### 3.3.4 Redução da angiogênese

A angiogênese é um processo natural principalmente em casos da ação inflamatória e reparação tecidual. Segundo Chung e Eun (2007) em um estudo comparativo entre o fotoenvelhecimento e o envelhecimento intrínseco, observou que a disposição dos vasos sanguíneos é diferente. No fotoenvelhecimento ocorre uma vasodilatação, possivelmente em decorrência do processo inflamatório gerado pelos

raios UV, portanto aumenta a angiogênese, mas de forma não controlada, alterando a arquitetura do tecido. A quantidade dos vasos também foi diferente em relação ao envelhecimento intrínseco, em ambos os tipos de envelhecimento observou-se a redução da quantidade dos vasos.

### 3.3.5 Hipotrofia das glândulas sebáceas

As glândulas sebáceas são controladas por hormônios estrogênicos e geralmente em mulheres na época do climatério, com a alteração nos níveis hormonais, há alteração na atividade das glândulas sebáceas. Com a redução da atividade dessas glândulas a produção do filme hidrolipídico, que reveste a pele, diminui e conseqüentemente altera o pH da pele, a hidratação, proteção e a homeostase (Rizzi *et al.*, 2021; Ruivo, 2014).

### 3.3.6 Alteração na atividade imunológica da pele

As células de Langerhans, consideradas linha de frente da ação imunológica da pele e de outros órgãos, com o envelhecimento, tem sua atividade reduzida, portanto o reconhecimento de antígenos fica comprometido. Portanto, ocorre redução da liberação de citocinas e fatores de crescimento e de inflamação que são importantes para a diapedese de células inflamatórias da corrente sanguínea para o tecido, aumentando as chances de infecções e prejudicando o reparo tecidual (Gilchrest; Krutmann, 2010).

## 3.4 TÉCNICAS ESTÉTICAS PARA TRATAMENTOS ANTIAGE

Para atenuar os efeitos do envelhecimento cronológico ou intrínseco, técnicas estéticas têm sido aprimoradas e a busca por tais procedimentos são frequentes, além disso a ampliação de atuação de diferentes profissionais da saúde na área está sendo difundida rapidamente na sociedade, portanto nos próximos tópicos serão abordadas algumas técnicas estéticas para tratamento dos resultados gerados pelo envelhecimento.

Com o avanço e propagação da estética na área da saúde, a busca por procedimentos *antiage* que são minimamente invasivos tem crescido continuamente, além dos cuidados com a pele em casa com os chamados *skin care*, portanto a ciência

e a tecnologia têm aprimorado os procedimentos e buscado novos produtos para tratamentos *antiage* (Bertossi *et al.*, 2019; Ganceviciene *et al.*, 2012).

Quadro 3 - Tipos de tratamento *antiage*

Classe de tratamento	Tipos de tratamentos
Cuidados cosmetológicos	<i>Skin care</i> diário – limpeza e hidratação Uso correto de protetor solar Procedimentos estéticos não invasivos
Agentes dermatológicos tópicos	Antioxidantes Reguladores celulares
Procedimentos invasivos	<i>Peelings</i> químicos Dispositivos de luz visível Luz Intensa Pulsada Foto-rejuvenescimento ablativa e não-ablativa do laser Radiofrequência Bioestimulação e rejuvenescimento da pele com injetáveis Prevenção de rugas dinâmicas Correção de rugas estáticas e anatômicas Restauração (redistribuição) de perda de gordura e volume, aumento da pele e contorno
Agentes sistêmicos	Reposição hormonal Antioxidantes
Correção do estilo de vida e hábitos - Fatores exógenos	Tabagismo Poluição Radiação solar UV Stress Nutrição, restrição alimentar e suplementação alimentar Atividade física Controle da saúde geral

Fonte: Adaptada de Ganceviciene *et al.* (2012)

Segundo o Quadro 3 é possível observar diferentes procedimentos para o tratamento *antiage*, porém para o sucesso e eficiência é preciso combiná-los de forma segura. O tipo de tratamento depende da *expertise* e avaliação do profissional esteta ou do médico dermatologista. Uma das substâncias mais utilizadas para tratamento e prevenção é a toxina botulínica tem a capacidade de bloquear temporariamente a liberação pré-sináptica da acetilcolina (Ach) na junção neuromuscular do local onde foi aplicada, causando uma atonia temporária da região. A acetilcolina é o neurotransmissor responsável pela contração muscular, sendo assim, como resultado da aplicação obtém o impedimento da formação de linhas de expressão dinâmicas e rugas (Arezzo, 2002; Brin; Hallett; Jankovic, 2002).

Já o uso de ácido hialurônico como preenchedor facial é usado para corrigir o volume e delinear os contornos da face, além de melhorar características como proporcionar o volume labial, ou uniformizar as bolsas ao redor dos olhos, pode reduzir pequenas depressões na pele, marcas e linhas suaves. O ácido hialurônico ainda

possui a característica hidratante e auxilia na melhora da elasticidade cutânea, benefícios importantes para tratamento *antiage* (Bertossi *et al.*, 2019).

Enquanto a técnica de microagulhamento, também denominada indução de colágeno percutâneo, tem como princípio provocar micro lesões padronizadas na região através utilizando um aparelho manual ou automatizado que contém micro agulhas de aço inoxidável. A profundidade e quantidade das lesões são variáveis conforme a necessidade e o objetivo do tratamento (exemplo de equipamento: Dermaroller® com agulhas de 0,25 mm a 2,5 mm) (Iosifidis; Goutos, 2019). A intenção de provocar micro lesões é justamente incentivar o próprio tecido a se regenerar uniformemente reduzindo aparência de cicatrizes e melhorando aspectos da pele com a promoção de síntese de colágeno causada pela ativação da via inflamatória e de reparo tecidual (Iosifidis; Goutos, 2019).

### 3.4.1 Peelings

O *peeling* é uma técnica consolidada e que tem diferentes finalidades, como por exemplo tratamento de acne, queratose, melasma, redução de cicatrizes e remoção de rugas e linhas de expressão. Os locais de aplicação geralmente são a face, pescoço, colo e mãos. Existem os *peelings* físicos e os químicos e que podem atingir diferentes profundidades da pele, classificando-os em superficiais, médios e profundos (Quadro 4) (Salam; Dadzie; Galadari, 2013; Soleymani; Lanoue; Rahman, 2018; Truchuelo; Cerdá; Fernández, 2016).

Quadro 4 - Classificação dos peelings e seus ativos

(continua)

Classificação do <i>peeling</i>	Ativos	Indicações
Superficial	Alfa-hidroxiácidos (AHA) – ácido glicólico (20-50%), ácido lático (10-30%), ácido mandélico (40%) Ácido tricloroacético (ATA) – 10-30% Solução de Jessner Beta-hidroxiácidos (BHA) – ácido salicílico ( $\leq 30\%$ ) Alfa-cetoácidos (ACA) – ácido pirúvico (50%) <i>Peeling</i> físico – cristal e diamante Ácido retinoico	Melasma, lentigos, acne, hiperpigmentação, fotoenvelhecimento, linhas de expressão suaves, queratose.  Pode atingir desde o estrato córneo até a camada basal da epiderme.
Médio	ATA (35-40%) <i>Peeling</i> de fenol 88% Combinação de Brady (CO <sub>2</sub> sólido + ATA 35%) Combinação de Monheit (Jessner + ATA 35%) Combinação de Coleman (Ác. Glicólico 70% + ATA 35%) Ácido salicílico (>30% com múltiplas aplicações)	Melasma, fotoenvelhecimento avançado, cicatrizes, queratose actínica, lentigo e hiperpigmentação. Atinge a derme reticular.

Quadro 4 - Classificação dos peelings e seus ativos

(conclusão)

Classificação do <i>peeling</i>	Ativos	Indicações
Profundo	Fórmula de Baker e Gordon (BG) – (fenol+água+tenssoativo+OC 2,6%) Fórmula de Hetter (FH) –(fenol+água+tenssoativo+OC) – com variações da concentração do OC (0,1 – 1,6%) ATA (≥50%)	Fotoenvelhecimento severo, Melasma profundo, cicatrizes profundas, hiperpigmentação, queratose actínica, rugas profundas. Atinge a derme papilar

Fonte: A autora

Baseado nos mecanismos de ação dos agentes químicos é possível obter diferentes resultados e seguir protocolos de aplicação. Por exemplo, os alfa-hidroxiácidos (AHA) são ácidos orgânicos extraídos da natureza, o ácido-glicólico é extraído da cana-de-açúcar, ácido láctico do leite e o ácido málico da maçã. Eles agem quebrando os corneossomas, reduzindo a adesão entre as células, aumentam a ação enzimática que leva a epidermólise e esfoliação em elevadas concentrações. (Fischer *et al.*, 2010; Sampaio; Rivitti, 2007).

O ácido salicílico é o principal representante dos beta-hidroxiácidos (BHA), é um agente queratolítico em concentrações de 3-5% usado para tratamento de acne, mas para *peeling* é necessário concentrações superiores (10-30%). Tem o pKa de 2,97 e sua ação lipolítica rompe a adesão entre as células que estão ligadas covalentemente, e isso resulta em descamação, devido à ação queratolítica, e ativação da mitose dos fibroblastos para o reparo tecidual (O'connor *et al.*, 2018; Salam; Dadzie; Galadari, 2013; Sampaio; Rivitti, 2007).

A solução de Jessner é composta por ácido salicílico (14%), resorcinol (14%), ácido láctico (14%) em etanol 95%. O resorcinol sendo semelhante ao fenol rompe as ligações de hidrogênio da queratina e o ácido láctico tem o mecanismo dos AHA, juntos promovem uma intensa descamação. Este é um *peeling* seguro e que apresenta bons resultados para tratamento da acne (Dayal *et al.*, 2017).

O ácido tricloroacético (ATA) é derivado do ácido acético, esse ácido induz necrose coagulativa das proteínas e células, sua profundidade de ação depende da concentração e da quantidade de aplicações. A praticidade desse *peeling* é a ausência da necessidade de neutralização, pois a coagulação das proteínas neutraliza o ácido naturalmente, porém em concentrações superiores a 50% do ácido essa neutralização é mais lenta e o risco de intercorrências é maior (Sampaio; Rivitti, 2007;

Truchuelo; Cerdá; Fernández, 2016). O fenol é um coagulante de proteínas e um agente cáustico e por esse motivo, causa querato coagulação. O grande problema de sua aplicabilidade como *peeling* é seu efeito nefrotóxico e cardiotoxico (Velasco *et al.*, 2004; Vigneron; Muggenthaler, 2016).

### 3.4.2 Formulações de fenol associadas ao óleo de Cróton

Com a primeira guerra mundial e com as lesões e cicatrizes deixadas pela guerra, passaram a utilizar o fenol para reduzir tais marcas, sendo *peelings* de fenol misturados com glicerina e óleo de Cróton realizados por “peeleiros leigos” a partir de 1920 na Califórnia. Os pesquisadores Brown, Kaplan e Brown (1960) desenvolveram um estudo sobre a ação do fenol na pele descrevendo técnicas e aplicações de uso. Na década de 1960, Baker e Gordon (BG) aprofundaram seus estudos nos efeitos do fenol como *peeling* e observaram que os resultados do *peeling* eram melhores quando adicionado alguns coadjuvantes (óleo de Croton, água e tensoativo) (Baker, 1962; Fischer *et al.*, 2010).

A fórmula de BG se difundiu no âmbito dos dermatologistas e a sua aplicação deixou de ser apenas para melhorar a aparência de cicatrizes e passou a ser usada para combater principalmente o envelhecimento. Em 2000, o dermatologista Dr. Hetter aprofundou seus estudos sobre a fórmula de BG e propôs diferentes formulações variando apenas a concentração do OC. Foi observado que com essa variação era possível obter resultados melhores, ou seja, menores concentrações de óleo apresentava um *peeling* mais superficial, e conforme aumentava a concentração a profundidade de ação aumentava, ao final do experimento determinou as concentrações ideais indicadas para cada região da face e pescoço ao aplicar o *peeling* de fenol + OC indicadas na Tabela 1 (Hetter, 2000d).

Tabela 1 - Comparativo entre as fórmulas de Baker e Gordon e fórmula de Hetter com suas indicações

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 periorcular	Pálpebras e pescoço
Grau		Profundo		Moderado	Suave	Muito suave

Fonte: Justo (2019)

Com as fórmulas propostas por Hetter, a segurança e o controle das lesões causadas pelo *peeling* de fenol com OC aumentaram, o que propõe novos questionamentos relacionados a importância do OC na fórmula, que deixa de ser considerado apenas um agente auxiliador na permeação do principal ativo (fenol) e conquista um papel importante como agente causador de *peeling* junto com o fenol. Devido à ausência de pesquisas mais profundas sobre esse *peeling* teorias são formuladas e baseiam-se principalmente na composição química do OC (JUSTO *et al.*, 2020; Wambier; Freitas, 2016; Zanini; Filho, 2005).

O problema maior relacionado ao *peeling* contendo fenol é a toxicidade relacionada a essa substância e não pode ser aplicado em pacientes cardiopatas ou com problemas renais. Pesquisas indicam que a substância atinge a corrente sanguínea em 15 minutos após aplicação e cerca de 25% da quantidade aplicada é absorvida. O fenol ao sofrer metabolização gera gás carbônico e água e o que não é metabolizado por essa via sofre oxidação ou é conjugado com sulfato e glucoronato e depois essas substâncias são excretadas pelos rins (Kadunc; Vanti, 2009).

Todos os pacientes ao serem submetidos por esse *peeling* devem ser monitorados por eletrocardiograma. Não se sabe ao certo o mecanismo de ação do fenol quanto a sua toxicidade no miocárdio, mas é possível observar taquicardia ou arritmia no eletrocardiograma (Fischer *et al.*, 2010; Vigneron; Muggenthaler, 2016). Em um estudo foram submetidos 181 pacientes do sexo feminino (idade média de 56 anos) ao procedimento do *peeling* de fenol e foi observado que 6,7% apresentaram arritmia cardíaca e entre elas, oito pacientes tiveram que ser socorridas (Landau, 2007).

Apesar dos riscos, o resultado obtido pelo *peeling* de fenol com o OC é excelente, pode rejuvenescer uma pessoa em até 20 anos. Primeiramente após a aplicação ocorre a fase da necrose que pode durar até 8 dias e gera um processo inflamatório intenso. Após esse período inicia a remodelação tecidual que tem duração de 2 a 6 meses, onde é observado ativação de fibroblastos, intensa produção de colágeno e fibras elásticas (Wambier *et al.*, 2019). O acompanhamento pós-*peeling* é muito importante para verificar a recuperação e garantir a eficácia do tratamento, evitando manchas e cicatrizes. Nesse processo de recuperação observa-se que no primeiro dia após a aplicação o local fica acinzentado e edematoso. No segundo dia após o tratamento com o auxílio de corticoides a coloração acinzentada desaparece e o edema reduz consideravelmente. Após sete dias a pele fica

restaurada, mas é possível observar pontos de eritema e hemorragias (Figura 9). O processo de recuperação é variável conforme o paciente (Hetter, 2000d).

Outra questão a ser considerada nas fórmulas de BG e Hetter é a instabilidade da formulação, observa-se que ocorre a separação das fases praticamente um minuto após a agitação, portanto o profissional ao fazer a aplicação do *peeling* deve sempre homogeneizar a fórmula previamente. Com a substituição do tensoativo Septisol® pelo Novisol®, observou-se uma melhora considerável na estabilidade da fórmula, porém a aplicação da tecnologia ou alternativas para buscar melhores resultados continua necessário (Justo *et al.*, 2020).

Figura 9 - Remodelação tecidual após o peeling com a fórmula de *Hetter very heavy*

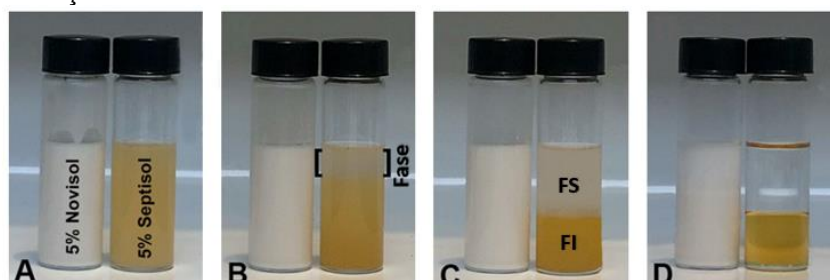


Fonte: Hetter (2000)

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

Na Figura 10 observa-se que 24 horas após agitação a fórmula contendo Novisol® como agente tensoativo se mantém homogênea, diferente da fórmula contendo Septisol® que após 1 min inicia a separação das fases. Justo (2019) em sua pesquisa constatou que a fase inferior possui os ativos causadores do *peeling*, pois nos resultados histológicos em porcos apresentou características inflamatórias e de remodelação tecidual semelhantes ao *peeling* de Hetter após aplicação, nela se concentra alguns ativos do óleo de croton e o fenol segundo os dados obtidos na caracterização química por espectrometria de massas.

Figura 10 - Comparação entre as fórmulas de *Hetter very heavy* com diferentes tensoativos 24 horas após a homogeneização



Fonte: Adaptado de Justo *et al.* (2021).



Nota: A – segundos após agitação; B – 1 minuto após a agitação; C – 10 minutos após a agitação; D – 24 horas após agitação; FS – Fase superior; FI – Fase Inferior.

A substituição do Septisol® pelo Novisol® ocorreu após o FDA (*Food and Drug Administration*) proibir o uso do triclosan (componente do Septisol®) em fórmulas detergentes, portanto foi adaptado e aceito a substituição por dermatologistas e cirurgiões plásticos devido a melhora na estabilidade da formulação, mas um estudo prévio realizado por Kass *et al.* (2020) sugeriu que quando as fórmulas são misturadas em concentrações diferentes do avaliado por Hetter, a ação do *peeling* é atenuada, comparada às fórmulas originais com Septisol®, e as fórmulas utilizadas foram preparadas com meses de antecedência para múltiplas aplicações. Há, portanto, necessidade de maiores estudos sobre a nova formulação.

### 3.5 PRODUTOS NATURAIS COM PROPRIEDADES ESTÉTICAS

O uso de produtos naturais na saúde é milenar, um dos primeiros registros desses produtos no tratamento de doenças é uma tábua de argila de sumérios de 4000 anos atrás. Entre esses registros está o uso medicinal do alho (*Allium sativum*) para tratamento de doenças circulatórias (Moudgil; Khalil, 2016).

A adesão e a preferência da população por compostos naturais devem-se a facilidade de encontrar tais produtos, além do empírico conhecimento relacionado a esses produtos correlacionando à ausência de efeitos adversos. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) 80% da população utiliza produtos naturais para tratamento de algum tipo de doença (Alves; Rosa, 2005; Moudgil; Khalil, 2016; Tran; Pham; Le, 2020).

As fontes dos produtos naturais são diversas, sendo a principal o uso de plantas. Pode-se usar a planta *in natura* ou a partir dela produzir extratos ou isolar compostos bioativos. Outra fonte pode ser microbiológica, a partir de técnicas de fermentação e cultura de células, já foram identificados enzimas, proteínas, polissacarídeos importantes para uso terapêutico. Alguns produtos têm origem animal como a quitosana e o mel (Lintner *et al.*, 2009).

Muitos produtos naturais têm atividade dermatológica e são usados em produtos cosméticos. Entre eles encontra-se o resveratrol por sua atividade anti-inflamatória e antioxidante. Estudos revelam que o resveratrol bloqueia a apoptose e a disfunção dos queratinócitos, portanto pode ser usado com a finalidade *antiage* e *antiacne*. O óleo de semente de uva é rico em resveratrol e outros polifenóis e é

amplamente usado em formulações cosméticas (Bastianetto *et al.*, 2010; Soleymani *et al.*, 2019).

A família Euphorbiaceae possui 229 gêneros e 6974 espécies, é uma família rica em propriedades terapêuticas e classes de metabólitos secundários diferenciadas. Algumas espécies possuem triterpenos com atividade anticâncer, outras espécies que possuem os diterpenos tiglianos apresentaram atividade anti-hiv, citotóxica e pró-inflamatória (Wang *et al.*, 2015).

O extrato das folhas de *Sapium sebiferum* (L.) Roxb (Euphorbiaceae) possui atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, e apresentou uma concentração inibitória mínima de 256 µg/mL, que é um importante agente patológico da pele. Sugere-se que os flavonoides presentes nesse extrato são os responsáveis pela atividade antibacteriana (Fu; Chen; Guo, 2020; He *et al.*, 2021).

A família Euphorbiaceae também é famosa por apresentar irritações dermatológicas, muitos pesquisadores relacionaram essa ação com os diterpenos tiglianos. A espécie *Euphorbia mauritanica* L. (Pencil Milkbush) (parte usada – látex) e forbol-12-miristato-13-acetato em um experimento *in vitro* aumentou a liberação de IL-8, citocina liberada por fibroblastos e queratinócitos, comparado com os tratamentos isolados (Guenther *et al.*, 2019).

O gênero *Croton* é composto por cerca de 1200 espécies, algumas já foram identificadas com atividade anticâncer, anti-inflamatória, antiúlcera e outros distúrbios digestórios e também patologias da pele (Rosa *et al.*, 2021).

A resina vermelha denominado popularmente como sangue de dragão (extraída da espécie *Croton lechler* Müll. Arg.), tem sua atividade anti-inflamatória de origem neural bem definida porém por mecanismos ainda desconhecidos, estudos sugerem a inibição da liberação da substância P (essa substância atua como um neuromodulador auxiliando em processos inflamatórios) (Pereira *et al.*, 2010).

O extrato das folhas de *Croton sparsiflorus* Morong. foi adicionado em uma formulação com propriedades antibacterianas, antifúngicas e fotoprotetora, seu emprego é justificado por apresentar fenólicos em sua composição e outras pesquisas relatam a atividade anticâncer (Boomi *et al.*, 2020).

### 3.6 ÓLEO DE CRÓTON E SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

O óleo de Cróton é extraído das sementes da espécie *Croton tiglium* L., essa espécie se desenvolve no sudeste da Ásia e seu uso é popular na Índia e na China. Pode atingir até 7 metros de altura, suas folhas são membranosas, glabra, ovalada e acuminada, e podem ter aproximadamente 10 cm de comprimento. As sementes dessa espécie são albuminosas (monocotiledônea), ovais e oblongas, a região dorsal é convexa (Figura 11) (Niu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2015).

Figura 11 - Espécie *Croton tiglium* L



Fonte: Adaptada de Plants of the World Online / Kew Science (Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:343631-1/images> Acesso em: 07 mar. 2022).

Entre as propriedades farmacoterapêuticas da espécie Croton está a atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, purgativa e digestiva, usada para tratamento de úlcera péptica e reumatismo. Seu uso para distúrbios gastrointestinais é mais comum principalmente na Ásia. Em um estudo verificaram que dependendo da concentração o OC pode aumentar ou diminuir a motilidade intestinal e modula a resposta inflamatória no local, sendo um fator importante para seu efeito purgativo (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008).

Hu *et al.* (2012) identificaram que o óleo de croton ativa os receptores muscarínicos (M3) e induz o influxo de cálcio na luz intestinal na parte do jejuno, parte removida para análise pós-tratamento *in vivo*, justificando seus efeitos purgativos.

Além do seu uso medicinal, sua toxicidade é muito conhecida, alguns estudos definem o OC como pró-inflamatório e relacionam esse efeito a uma classe específica de metabólitos, diterpenos do tipo tigliano (ésteres de forbóis). O TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) é considerado o principal forbol do OC, ele foi isolado e atualmente em várias pesquisas é usado para promover tumor (Ezemma, 2020; Niu *et al.*, 2020).

Entretanto, muitas pesquisas que isolaram ésteres de forbóis e testaram essas substâncias *in vivo* ou *in vitro* frente a algumas células cancerosas, verificaram que possuíam também atividade anticancerígena, pois perceberam a retração do tumor ou morte celular (Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

O OC é usado em pesquisas como promotor de inflamação para testar outros ativos/extratos anti-inflamatório. Geralmente o modelo inflamatório usado é aplicar na orelha do animal o OC em uma concentração de 4% diluído em acetona, o principal efeito inflamatório observado no modelo é o edema (Luo *et al.*, 2014; Padilla-Camberos *et al.*, 2021; Pilipovic *et al.*, 2010; Sugihartini *et al.*, 2017).

No geral, o OC por ser obtido de uma espécie vegetal, possui muitos compostos químicos, devido as pesquisas realizadas nos últimos anos, alguns foram identificados e seus efeitos biológicos avaliados. A grande quantidade de ésteres de forbóis presente em sua composição, são altamente tóxicos e provocam intensa inflamação, por outro lado o OC possui outras classes de metabólitos secundários como flavonoides, alcaloides e outros tipos de diterpenos que podem auxiliar na modulação inflamatória (Blumberg, 1986; Li *et al.*, 2016).

Outro fator importante é a relação dose dependente e está relacionado ao tipo de núcleo central da substância, portanto conforme a concentração o OC pode-se apresentar maior toxicidade, apresentando efeitos anti ou pró-inflamatórios e anti ou pró-cancerígeno (Hirota *et al.*, 2010).

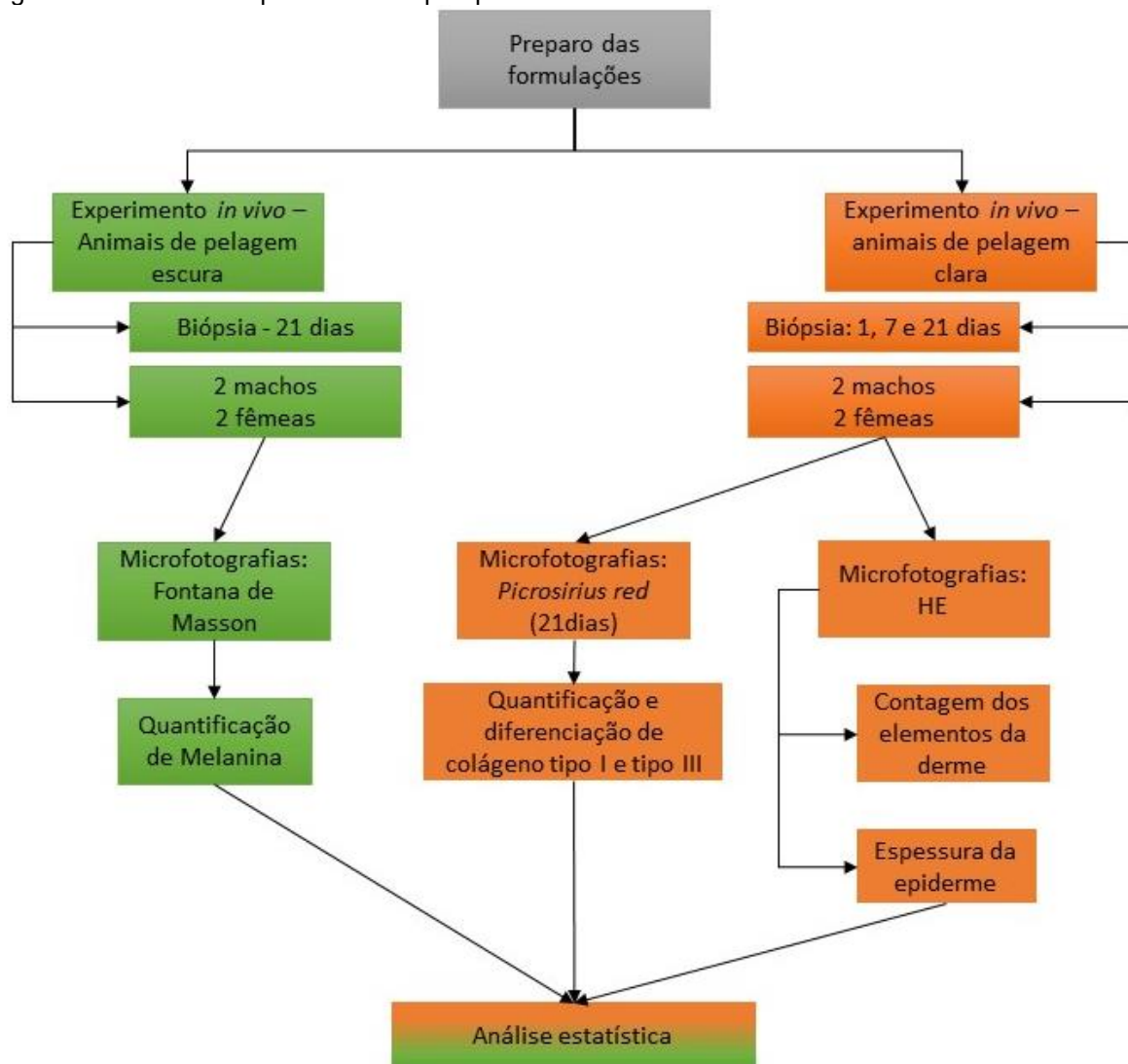
Portanto, o OC é um componente vegetal em potencial quando usado por profissionais qualificados, porém os estudos precisam ser aprofundados para avaliar o risco e os benefícios do OC em procedimentos estéticos, inclusive na fórmula de Hetter.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento dessa pesquisa seguiu-se o desenho experimental contido na Figura 12.

Figura 12 - Desenho experimental da pesquisa



Fonte: A autora

### 4.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES

As concentrações dos ativos e as formulações foram definidas conforme descrito por Hetter (2000d). Na fórmula de Hetter (FH) é necessário preparar a solução estoque previamente, contendo 96% de fenol (88%) e 4% de OC, na sequência é

adicionado a água (55%), Septisol® (5%), solução estoque (40%), essa foi considerada como o controle positivo (C<sup>+</sup>).

O controle negativo (C<sup>-</sup>) foi composto por água (95%) e Septisol® (5%). As demais formulações foram preparadas conforme concentrações dos componentes descritos nas Tabelas 2, 3, 4 e 5. Os insumos foram homogeneizados e finalizados para aplicação. Para uma melhor análise dos resultados as amostras foram organizadas conforme a finalidade das análises, portanto os resultados estão organizados em 5 abordagens diferentes. Na Abordagem 1, foi comparada a ação dermatológica da fórmula contendo a solução estoque após ser armazenada por 3 meses em vidro âmbar, temperatura ambiente, protegida da luz e umidade.

Tabela 2 - Fórmulas definidas para a Abordagem 1 – Avaliação do efeito *peeling* da fórmula contendo a solução estoque após armazenada por 3 meses

Amostra	Características das amostras	Formulação	(%)
C-	Controle negativo	Água	95
		Septisol®	05
C+	Formulação de Hetter com a solução estoque recém-preparada	Água	55
		Septisol®	05
		Solução estoque	40
FH3	Fórmula de Hetter - Solução estoque de Hetter com 3 meses de preparo	Água	55
		Septisol®	05
		Solução estoque	40
SE	Solução estoque de Hetter (recém-preparada)	Fenol	96
		Óleo de Cróton	04

Fonte: A autora

Na Abordagem 2 foram comparadas as fórmulas contendo ou não o OC.

Tabela 3 - Fórmulas para a Abordagem 2 - Comparação entre Fórmula de *Hetter very heavy* e a fórmula contendo fenol sem óleo de Cróton

Amostra	Características das amostras	Formulação	(%)
C-	Controle negativo	Água	95
		Septisol®	5
C+	Controle positivo	Água	55
		Septisol®	5
		Solução estoque	40
SO	Formulação de Hetter recém-preparada (a partir da solução estoque)	Água	60
		Septisol®	5
		Fenol (88%)	35
SF	Fórmula sem fenol (SF)	Água	93,4
		Septisol®	5
		Óleo de Cróton	1,6

Fonte: A autora

Quanto a Abordagem 3 foi avaliado a ação do OC diretamente na derme sem diluição por meio da aplicação com um dermatógrafo. Como controle negativo foi utilizado a tinta de nanquim aplicado da mesma forma.

Tabela 4 - Amostras para a Abordagem 3 – Avaliação dos efeitos dermatológicos do óleo de Cróton por meio da aplicação intradérmica

Amostra	Características das amostras	Formulação	(%)
C-	Controle negativo	Água	95
		Septisol®	5
C+	Controle positivo	Água	55
	Formulação de Hetter recém-preparada (a partir da solução estoque)	Septisol®	5
		Solução estoque	40
IOC	Óleo de Cróton – aplicação dérmica Com máquina de tatuagem (IOC)	OC	100
TAT NAN	Tinta de Nanquim – aplicação dérmica Com máquina de tatuagem (TAT NAN)	TN	100

Fonte: A autora

Em relação a abordagem 4, o fenol foi substituído pelo ATA (ácido tricloroacético) e AG (ácido glicólico).

Tabela 5 - Fórmulas para a Abordagem 4 – Comparação entre a fórmula de Hetter e fórmulas contendo ácido tricloroacético e ácido glicólico

Amostra	Características das amostras	Formulação	(%)
C-	Controle negativo	Água	95
		Septisol®	05
C+	Controle positivo	Água	55
	Formulação de Hetter recém-preparada (a partir da solução estoque)	Septisol®	05
		Solução estoque	40
AG	Substituição do fenol por Ác. Glicólico (AG)	Água	58,4
		Septisol®	05
		Óleo de Cróton	1,6
		Ác. Glicólico	35
ATA	Substituição do fenol por Ácido tricloroacético (ATA)	Água	58,4
		Septisol®	05
		Óleo de Cróton	1,6
		ATA	35

Fonte: A autora

Na Abordagem 5 as amostras 1 e 2 foram avaliadas em animais de pelagem escura no 21º dia da aplicação com a finalidade de verificar a perda/reposição de melanina no tecido após a realização do *peeling* com a FH.

#### 4.3 EXPERIMENTO *IN VIVO*

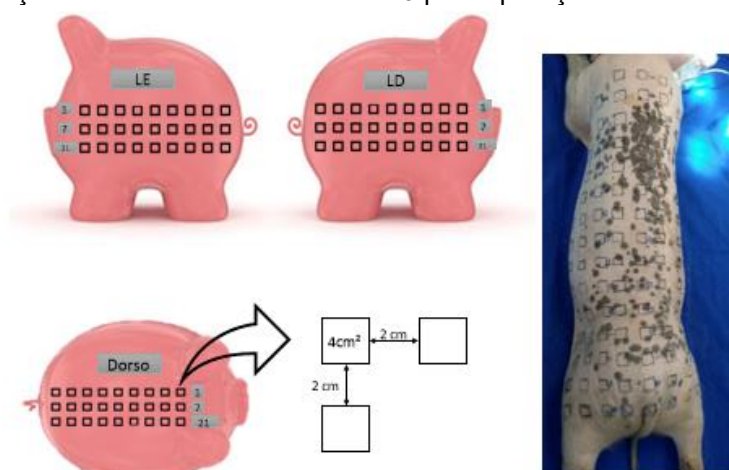
O modelo *in vivo* escolhido para a realização do experimento foram os porcos, portanto foi enviado ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) o requerimento para a realização do experimento, a solicitação foi aprovada sob número de protocolo 034/2017. Foram selecionados 4 animais de pelagem escura e 4 animais de pelagem clara (sendo 2 machos e 2 fêmeas) entre 4-5 meses de idade com peso médio de 30-35 kg.

O procedimento ocorreu segundo descrito por Larson, Karmo e Hetter (2009) com adaptações. Os animais foram tranquilizados com a aplicação via intramuscular das seguintes substâncias acepromazina 0,4 mg/Kg, cetamina 14 mg/Kg e Xilasina 0,2 mg/Kg. Na sequência foram sedados pela via intravenosa com propofol 5 mg/Kg e permaneceram inconscientes durante todo o procedimento. A anestesia ocorreu por inalação com isoflurano em uma concentração alveolar mínima de 1,2 a 1,7%.

Para a aplicação das amostras foi realizada a raspagem dos pelos e demarcações com caneta permanente (Figura 13), foram utilizados o lado esquerdo (LE), lado direito (LD) e o dorso (DO) do animal e foram feitas 3 linhas de aplicação para cada lado referenciando aos dias de biópsia (1, 7 e 21 dias) após a aplicação (Figura 12). Os locais para aplicação demarcados tinham 4 cm<sup>2</sup> com distância de 2 cm entre cada área. Os locais de aplicação das amostras foram randomizados conforme mapa pré-definido para cada animal.

No momento da aplicação das amostras foi realizada a homogeneização com o *swab*. As amostras foram preparadas 1 h antes da aplicação. Os animais foram mantidos sob supervisão, reclusos com água e alimentação em horários programados. Após 1, 7 e 21 dias foram realizadas as biópsias com punch de 4 mm de diâmetro. As biópsias ficaram armazenadas por 72 horas em formol tamponado a 10%, posteriormente foram armazenadas em etanol 70% até o tratamento no histotécnico (LEICA® TP 1620), no qual passaram pelo processo de desidratação e diafanização. Na sequência foram emblocadas em parafina fundida a 60 °C. As biópsias foram cortadas no micrótomo (LEICA® RM 2125RT) e apresentaram uma espessura final de 5 µm, após secas e fixas, os cortes histológicos foram corados.

Figura 13 - Demarcações realizadas no modelo *in vivo* para aplicação das amostras

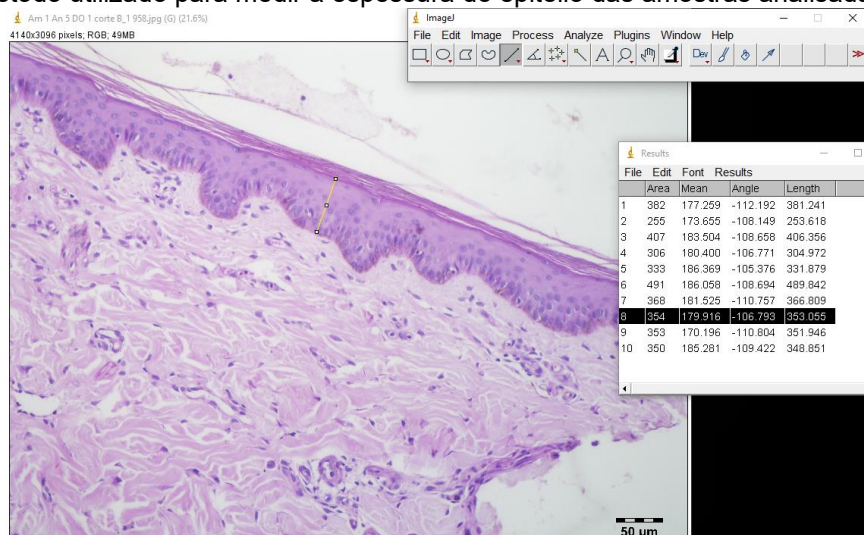




#### 4.4 AVALIAÇÃO UTILIZANDO A COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

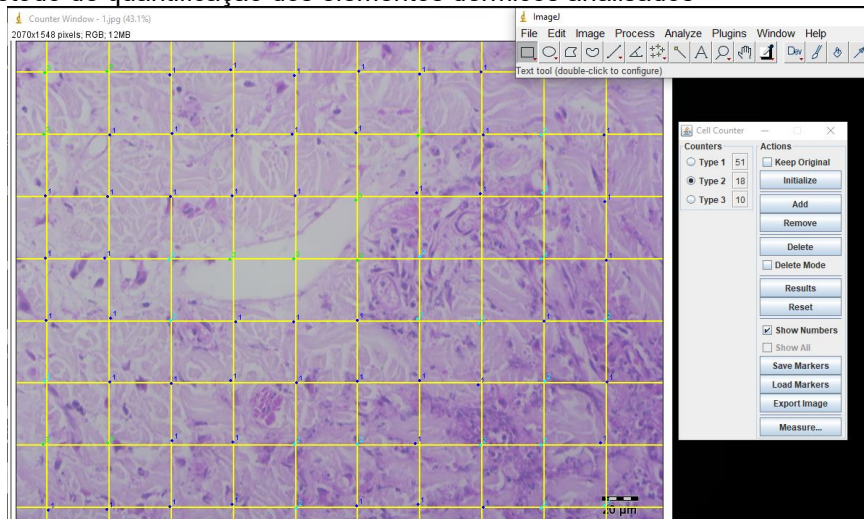
Após a realização dos cortes histológicos, foram selecionadas 4 lâminas aleatoriamente (2 referentes ao LE ou LD, e 2 do DO), e os tecidos foram desparafinizados e hidratados para serem corados por HE. Depois de coradas, foram selecionados 2 cortes histológicos de cada lâmina para serem fotografados. Para cada corte foram realizadas 5 microfotografias na ampliação de 200X para medir a espessura do epitélio, e foram realizadas 5 microfotografias na ampliação de 400X para quantificação dos componentes teciduais básicos da derme (células inflamatórias, fibroblastos, substância fundamental e colágeno). As microfotografias foram analisadas por meio do programa Image J® 1.51j8 (Figura 13 e Figura 14).

Figura 14 - Método utilizado para medir a espessura do epitélio das amostras analisadas



Fonte: A autora

Figura 15 - Método de quantificação dos elementos dérmicos analisados

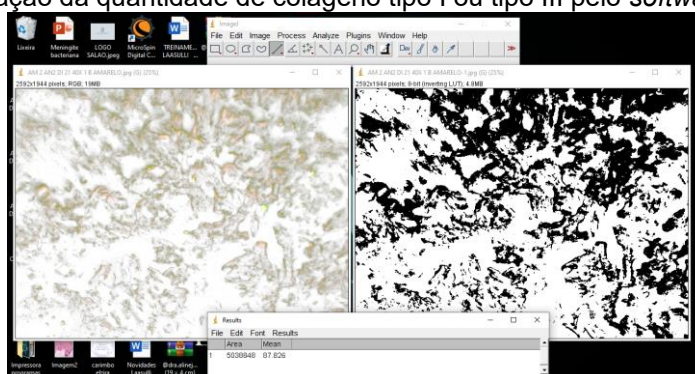


Fonte: A autora

#### 4.5 AVALIAÇÃO UTILIZANDO A COLORAÇÃO PICROSIRIUS RED

Foram selecionadas aleatoriamente as biópsias do dia 21 para a realização dos cortes. Os tecidos foram desparafinizados e hidratados para serem corados usando o *Picrosirius Red* em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Foram realizadas microfotografias com ampliação de 400x no microscópio Olympus AX70 com luz polarizada. A intensidade da luz foi padronizada para evitar variações na análise. As microfotografias foram analisadas através do programa Image J® 1.51j8. Essa coloração permitiu quantificar e diferenciar o colágeno tipo I e tipo III no tecido (Figura 16).

Figura 16 - Quantificação da quantidade de colágeno tipo I ou tipo III pelo *software* Image J®

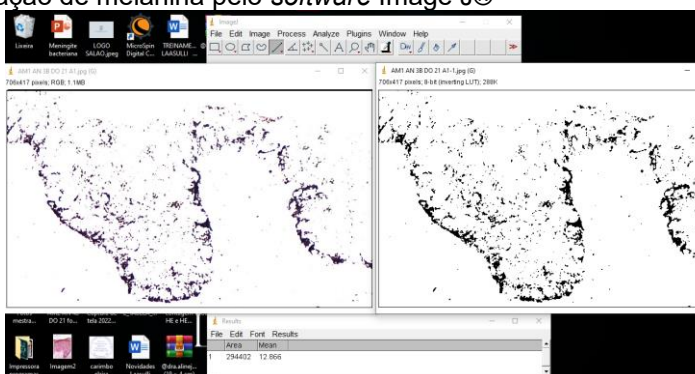


Fonte: A autora

#### 4.6 AVALIAÇÃO USANDO A COLORAÇÃO FONTANA MASSON

Através da coloração de Fontana Masson foi quantificado nos animais de pelagem escura a melanina, para isso foram selecionadas aleatoriamente as biópsias do dia 21 referentes ao C+ e C-. Os tecidos foram desparafinizados e hidratados para serem corados. Foram realizadas microfotografias em ampliação de 200x na faixa da epiderme para serem avaliados no programa Image J® 1.51j8 (Figura 17).

Figura 17 - Quantificação de melanina pelo *software* Image J®



Fonte: A autora

#### 4.7 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do *software* GraphPad Prism® 9.3.0, a escolha do método foi o ANOVA (Analysis of Variance) de duas vias e pós-teste de Tukey e para a avaliação estatística dos resultados obtidos pelo HE e *Picrosirius Red*, os resultados obtidos pela coloração de Fontana Masson foram avaliados pelo Teste T. As variantes foram o tempo e o tratamento, foi utilizado o intervalo de confiança de 95% e o valor de  $p < 0,05$  refere-se as amostras estatisticamente diferentes.

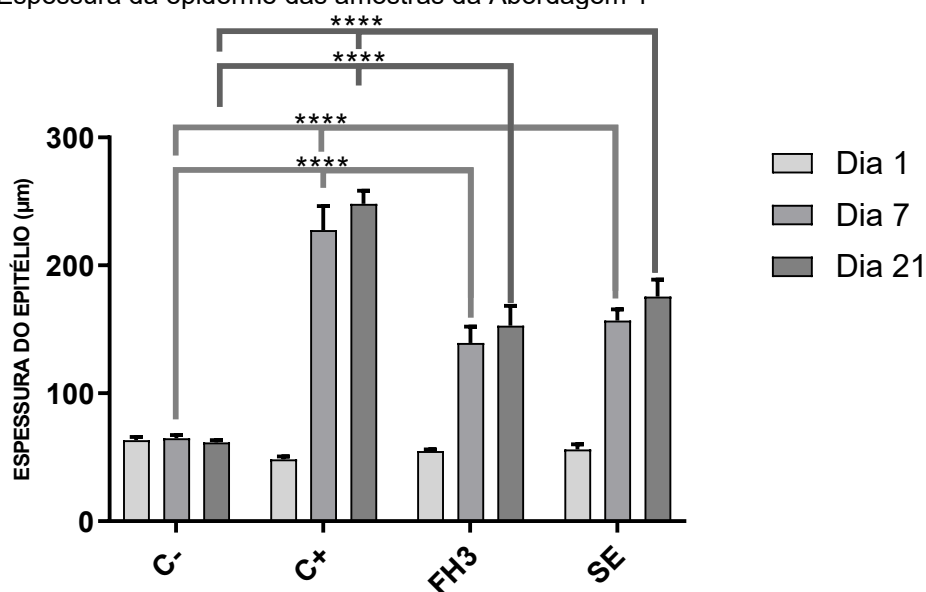
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ABORDAGEM 1 – AVALIAÇÃO DO EFEITO PEELING DA FÓRMULA CONTENDO A SOLUÇÃO ESTOQUE APÓS ARMAZENAMENTO POR 3 MESES

Para a Abordagem 1 foram realizadas análises quanto a estabilidade da formulação de Hetter após 3 meses de armazenamento, já que Justo (2019) identificou que ocorre alteração química do OC dentro de 3 meses através de análise cromatográfica.

Os primeiros indícios que a ação do *peeling* não é tão eficaz ao utilizar a SE após armazenamento por 3 meses está na avaliação da espessura da epiderme, visto que essa espessura da FH3 não é tão pronunciada quando comparada ao C+, porém ainda apresenta certa atividade pois é diferente estatisticamente em relação ao C-, essas diferenças permanecem para os dias 7 e 21 após aplicação (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Espessura da epiderme das amostras da Abordagem 1



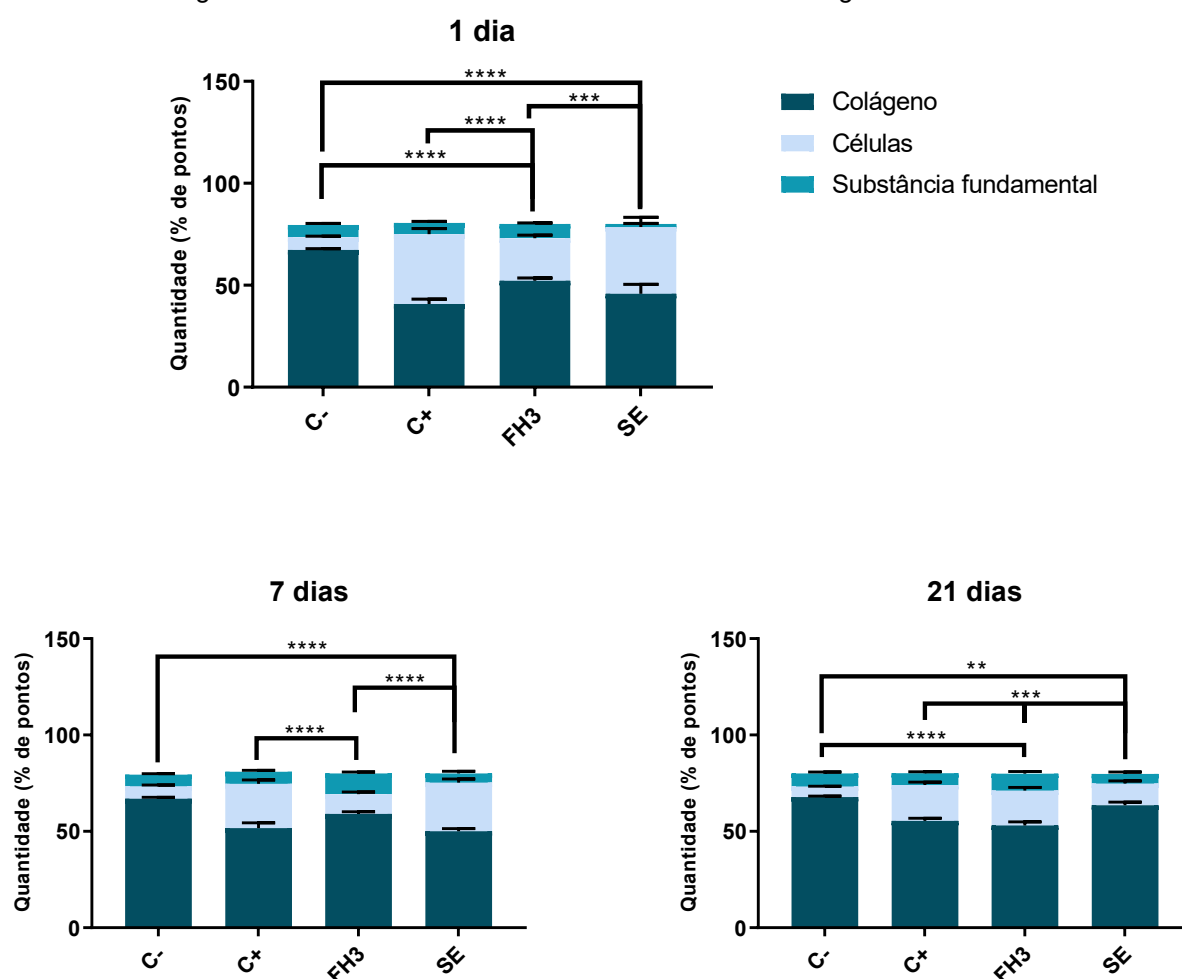
Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

No Gráfico 1, também é possível observar que a SE ao ser aplicada sem diluição na pele não gera um resultado tão satisfatório quanto ao aumento da espessura da epiderme, indicando que seu efeito não é concentração dependente, já que na FH, no qual apresenta menor concentração de fenol e menor concentração de OC, é possível se constatar uma irritação dérmica mais pronunciada ao observar a hiperplasia na epiderme.

Essas diferenças também são observadas quanto aos elementos teciduais; ressalta-se que a FH3 não apresenta os mesmos efeitos comparado com o C+ que foi obtido com essa solução recém-preparada (Gráfico 2). Observa-se que a FH3 desenvolveu um infiltrado inflamatório menos intenso e diferente estatisticamente do C+ e da SE no primeiro dia após a aplicação. Apesar do efeito menos intenso, apresentou diferença também se comparado com o C-.

Gráfico 2 - Contagem dos elementos teciduais das amostras da Abordagem 1



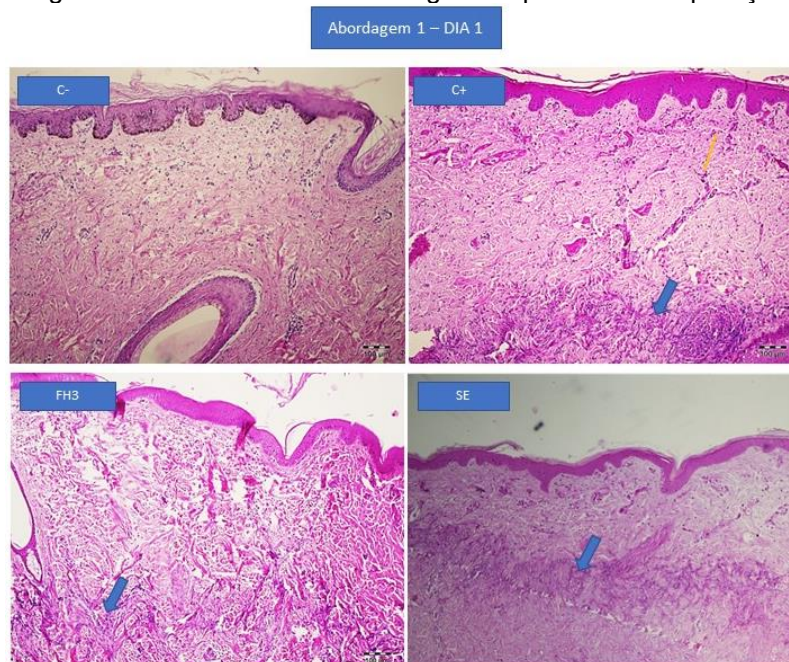
Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Quanto a SE, é possível observar que ocorreu um infiltrado inflamatório tal qual o observado para o C+, mas ao analisar as microfotografias, esse infiltrado inflamatório não foi tão profundo (Figura 18), justificando o resultado no dia 21, pois possivelmente o tecido se recuperou mais rapidamente, já que a quantidade de células diminuiu drasticamente sendo diferente das outras amostras observando-se uma redução na quantidade de fibroblastos.



Figura 18 - Microfotografias das amostras da Abordagem 1 após 1 dia da aplicação



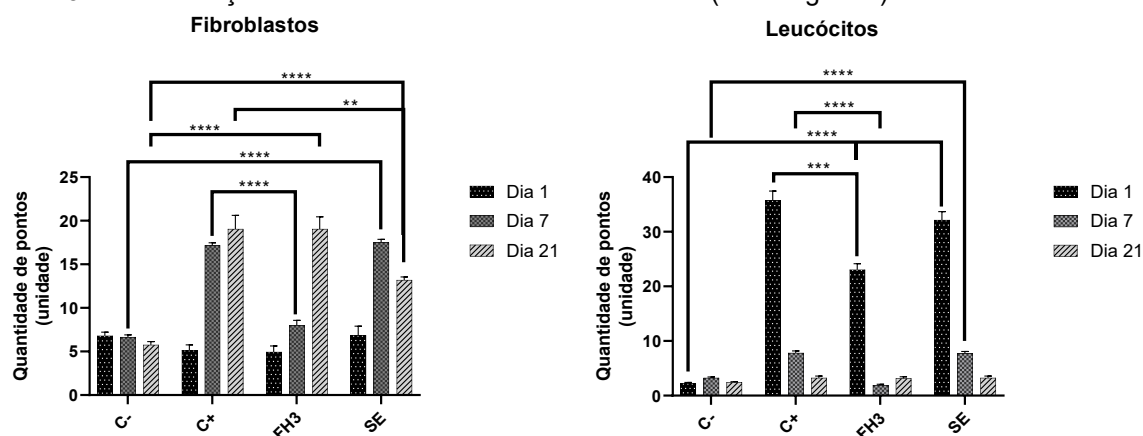
Fonte: A autora

Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 100X. Flecha azul indica o infiltrado inflamatório.

Após realizar a contagem diferenciando as células, foi observado um aumento de células inflamatórias considerável para as amostras teste no 1° dia após a aplicação (Gráfico 3). Porém a FH3 apresentou um recrutamento de células inflamatórias menor que o C+ e a SE.

Em relação aos fibroblastos, houve um aumento gradativo em relação ao C+ entre os dias 7 e 21. A FH3 no 7° dia não teve um aumento significativo de fibroblastos, mas foi superado no dia 21. A SE apresentou um aumento considerável no 7°, porém reduziu no 21° dia. Portanto ocorreu um padrão diferente do C+.

Gráfico 3 - Diferenciação entre células dos tecidos analisados (Abordagem 1)

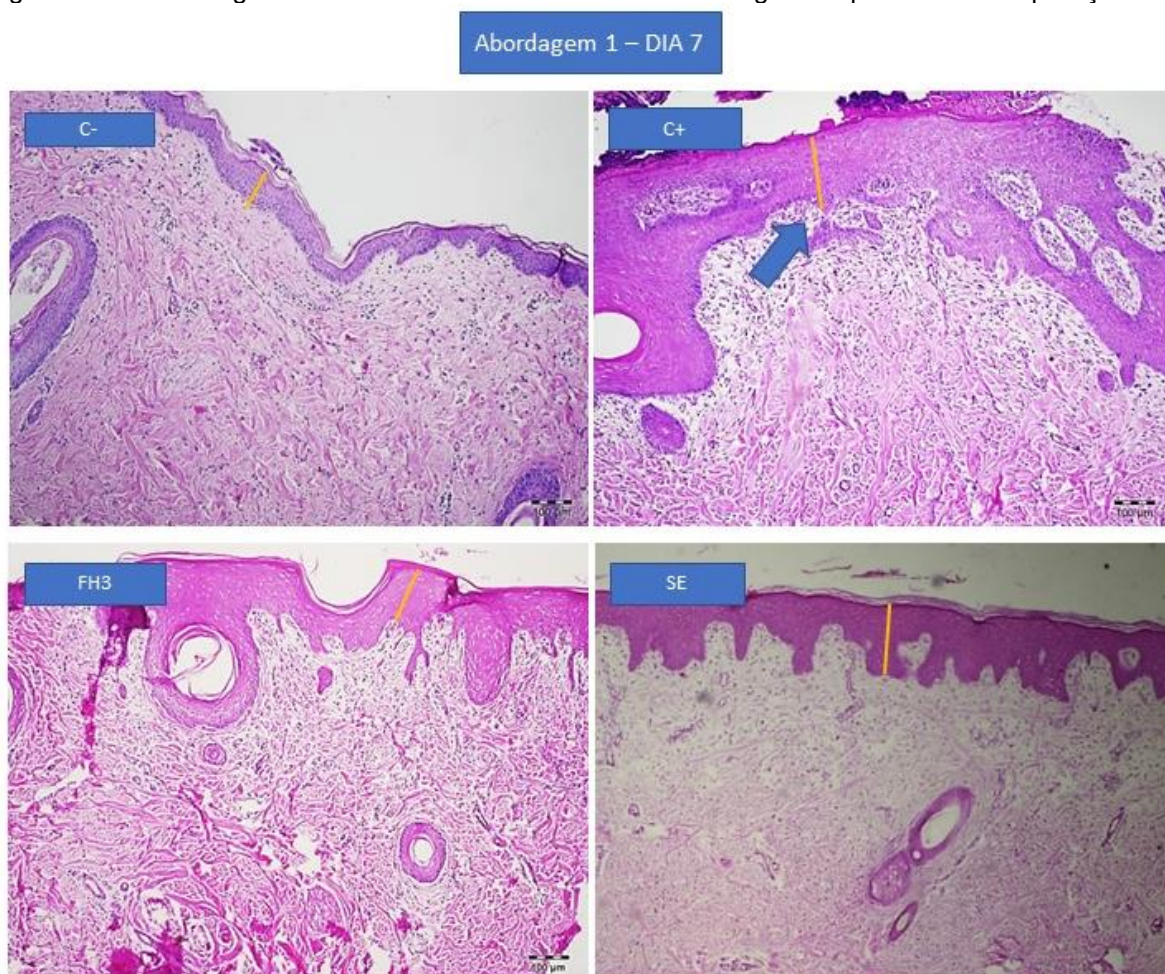


Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Em relação aos 7 dias após a aplicação, ao analisar as fotografias apresentadas na Figura 19, é possível observar claramente que a espessura da epiderme é maior para o C+. Quanto aos elementos teciduais a quantidade de células da FH3 é menor e diferente estatisticamente comparado ao C+ e a SE, possivelmente, visto que no dia 21 é maior, a ativação dos fibroblastos para essa amostra foi mais tardia, comparada as outras amostras.

Figura 19 - Microfotografias relacionadas as amostras da Abordagem 1 após 7 dias da aplicação



Fonte: A autora

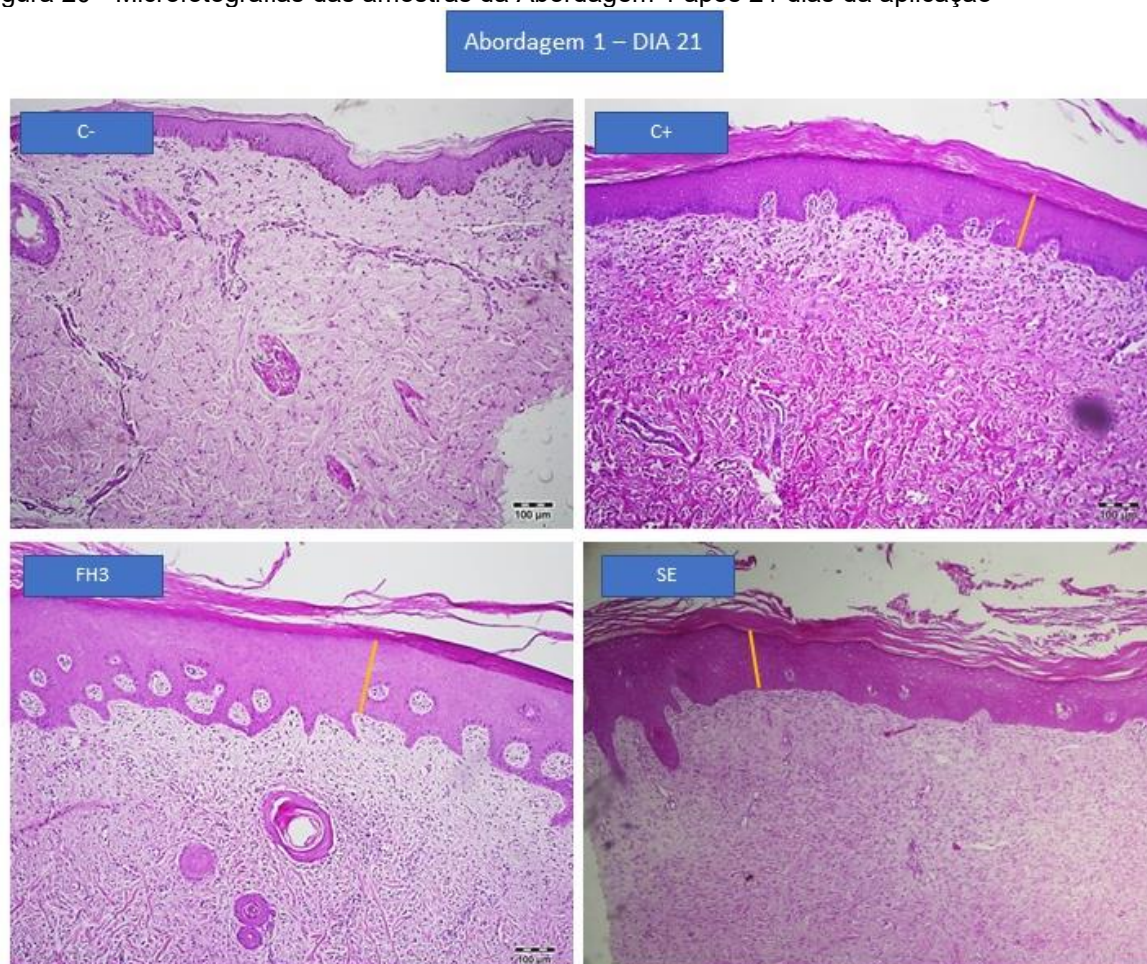
Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 100X. Flecha azul indica hiperplasia pseudoepiteliomatosa, traços amarelos indicam a diferença da espessura da epiderme.

No 21º dia após analisar as fotografias apresentadas na Figura 19, estruturalmente as amostras 3 e 4 sofreram mudanças se comparadas com o C-, pois ocorreu um aumento considerável na epiderme e aparentemente houve produção de colágeno, visto que fibras mais finas estão bem distribuídas na derme papilar, semelhante ao C+ (Figura 20).



Geralmente para a aplicação da FH, muitos dermatologistas encomendam suas fórmulas em farmácias de manipulação que concedem o prazo de validade para no máximo 3 meses conforme estabelecido em compêndios oficiais como a Farmacopeia Brasileira. Pelas análises cromatográficas realizadas por Justo (2019) com o OC por 3 meses após aberto, observou-se através da quimiometria que o OC apresenta redução significativa de ácidos graxos, entre eles o ácido palmítico, isso justifica-se pela facilidade de oxidação que óleos podem sofrer devido ao mal armazenamento (ANVISA, 2010; CHEN *et al.*, 2017).

Figura 20 - Microfotografias das amostras da Abordagem 1 após 21 dias da aplicação



Fonte: A autora

Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 100X. Traços amarelos indicam a diferença da espessura da epiderme.

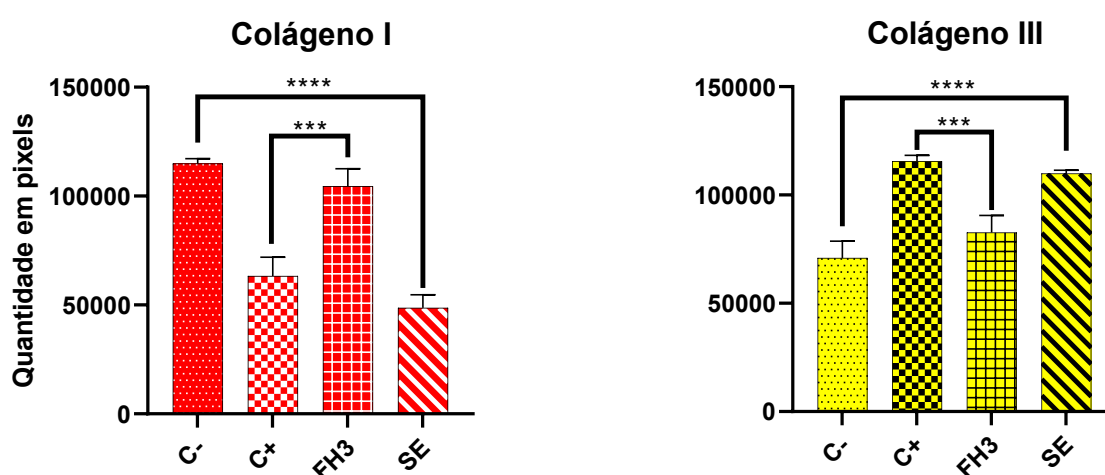
Além da degradação do OC, o fenol é um composto facilmente oxidável e nesse processo oxidativo pode gerar substâncias tão tóxicas quanto o composto inicial, e por estar presente abundantemente na SE junto com o OC torna a solução menos estável e mais tóxica, não sendo aconselhável o armazenamento dessa solução por mais de 3 meses (DEVLIN; HARRIS, 1984).



Em relação a SE não apresentar resultados superiores ao C+ mesmo possuindo maior concentração de fenol e de OC, pode-se inferir que o processo de *peeling* não seja concentração dependente, efeito observado por Hetter (2000c), visto que descreveu que concentrações superiores a 1,6% de OC não promoveu melhores resultados quanto ao *peeling* e concentrações de fenol superiores também não influenciam e só aumentará sua toxicidade.

No Gráfico 4 observou-se que a FH3, novamente, não apresentou o mesmo padrão da amostra C+, pois não estimulou consideravelmente a produção de colágeno tipo III.

Gráfico 4 - Resultado da quantidade de colágeno produzida após a aplicação (Abordagem 1)

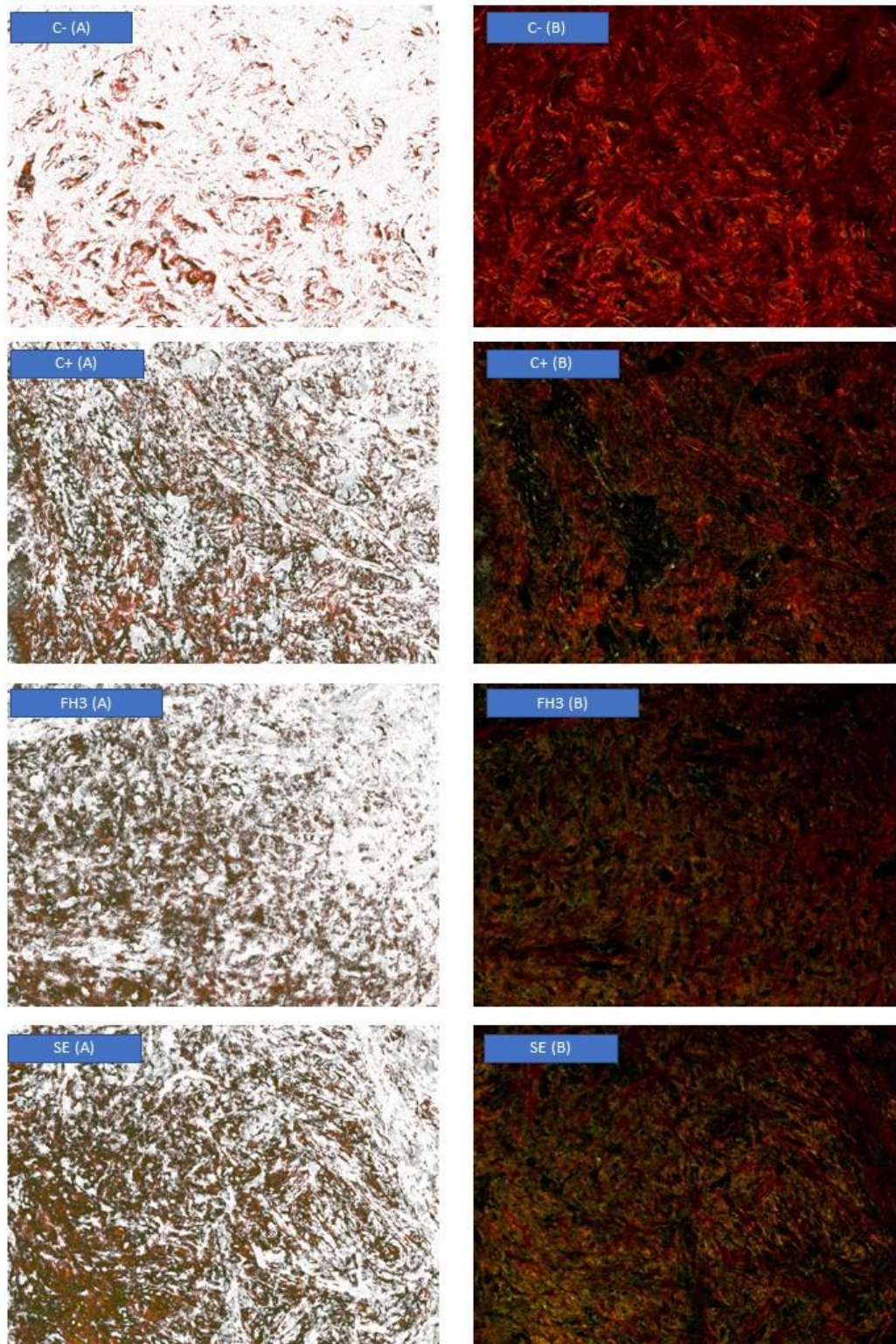


Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Nas microfotografias (Figura 21) observa-se que a FH3 apresenta menor densidade de colágeno tipo III que o C+ e na SE essa densidade não é uniforme.

Figura 21 - Microfotografias obtidas após coloração por Picosírius red nas amostras da Abordagem 1



Fonte: A autora

Nota: Coloração *Picosirius Red*. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 200X. (A) – Fibras de colágeno tipo III isoladas das fotografias (B) para contagem dos pixels. (B) – Fotografia obtida das amostras coradas pela técnica.

## 5.2 ABORDAGEM 2 – COMPARAÇÃO ENTRE FÓRMULA DE HETTER VERY HEAVY E A FÓRMULA CONTENDO FENOL SEM ÓLEO DE CRÓTON (OC)

Ao comparar a SO com os grupos controle é possível observar que a espessura da epiderme apresentou diferença estatística no 7º dia após a aplicação, demonstrando apresentar uma espessura da epiderme maior em relação ao C<sup>-</sup>, porém menor comparado ao C<sup>+</sup>. No 21º dia a epiderme retraiu consideravelmente comparando ao 7º. Ao comparar com os controles, a SO se manteve diferente estatisticamente, mas essa diferença é maior comparado ao C<sup>+</sup>, no qual a espessura da epiderme é maior que no 7º e não houve retração.

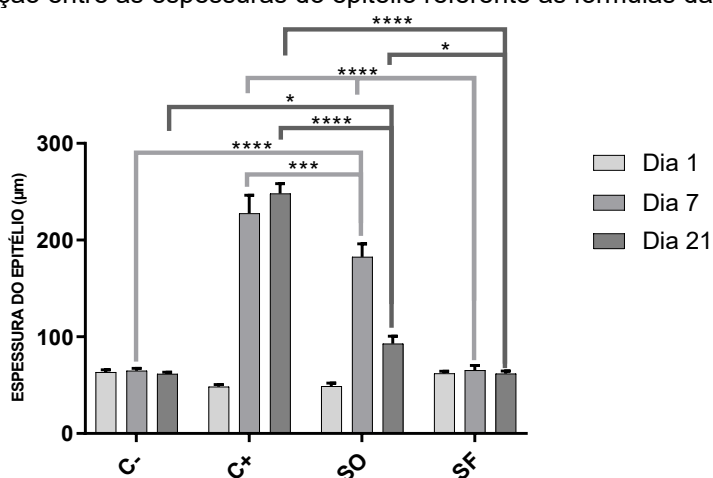
A SF não apresentou diferença estatística comparado ao C<sup>-</sup> em todos os dias após a aplicação, ou seja, não teve aumento significativo na espessura da epiderme, portanto nos dias 7 e 21 a amostra apresentou diferença significativa comparado ao C<sup>+</sup> e SO.

É válido ressaltar que a espessura da epiderme é uma característica importante para identificar se ocorreu lesão tecidual, pois no processo de reparação, com a proliferação de queratinócitos para fechar a ferida ocorre hiperplasia da epiderme; portanto a fórmula contendo só o fenol ocasionou alguma lesão, porém a epiderme retraiu rapidamente, visto que no 21º dia essa espessura está menor comparado ao 7º dia após a aplicação da amostra.

Porém a amostra tratada com a fórmula sem fenol (SF), que continha apenas o OC não apresentou alteração na espessura da epiderme. Sugerindo que o óleo não permeou profundamente o tecido, não gerando uma lesão significativa a ponto de estimular a proliferação e diferenciação das células da epiderme. No Gráfico 5 é possível observar a espessura da epiderme nos diferentes dias para as diferentes amostras.

Em relação aos elementos teciduais após a contagem das lâminas coradas em HE, no 1º e 7º dia após a biópsia, para as amostras estudadas, foi observado que a SO apresentou um aumento na quantidade de células comparado com ao C<sup>-</sup> e a SF, porém a quantidade de células é menor e diferente comparado a C<sup>+</sup>. A SF não apresentou diferença significativa em relação ao C<sup>-</sup> em todos os dias após aplicação (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Comparação entre as espessuras do epitélio referente as fórmulas da Abordagem 2

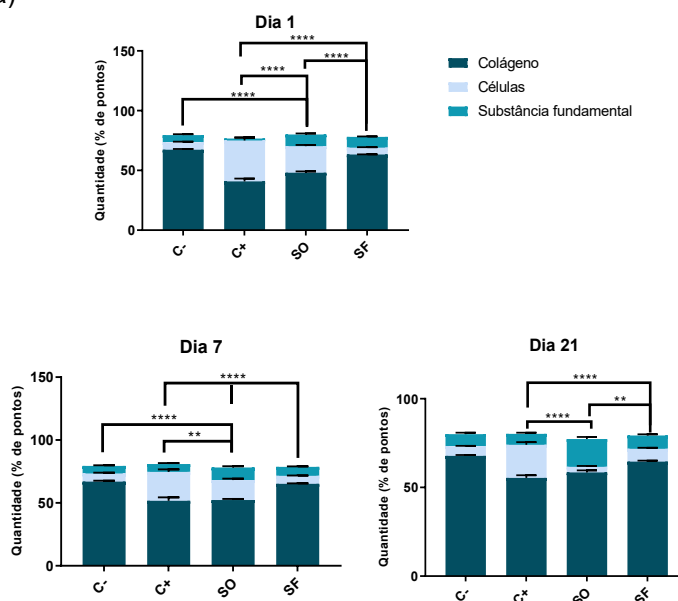


Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,0,5$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

No 21° dia a SO apresentou menor quantidade de células, e não é significativa a diferença em relação ao C-, mas em relação ao C+ e a SF sim. Fisiologicamente ao ocorrer uma lesão tecidual no primeiro dia ocorre a quimiotaxia de células inflamatórias; após alguns dias, as células inflamatórias diminuem e os fibroblastos são ativados e aumentam em tamanho e em quantidade. Com os resultados obtidos para a SO, pode-se considerar que apresentou lesão menor em comparação ao C+.

Gráfico 6 - Comparativo entre as fórmulas das Abordagem 2 quanto aos elementos teciduais (Coloração Hematoxilina e Eosina)



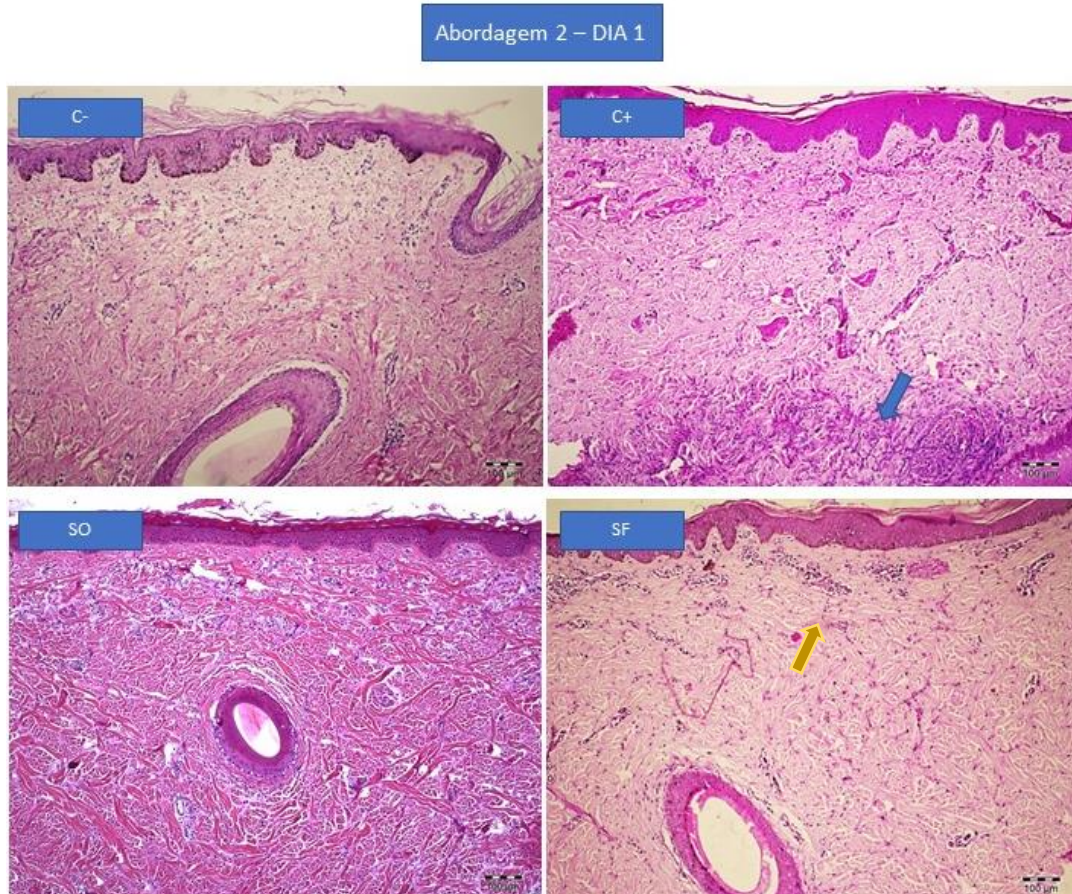
Fonte: A autora



Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Apesar da contagem dos elementos teciduais não apresentarem diferença significativa para a SF, ao visualizar as fotografias das biopsias é possível observar células inflamatórias próximas a epiderme no 1º dia após a aplicação, portanto o OC não permeou consideravelmente a pele para causar uma inflamação mais profunda e intensa, mas permeou o suficiente para ser observado a presença de células inflamatórias, indicando que o OC apresenta atividade pró-inflamatória que juntamente com o fenol causam um *peeling* profundo e intenso (Figura 22).

Figura 22 - Microfotografias das amostras da Abordagem 2 após 1 dia da aplicação



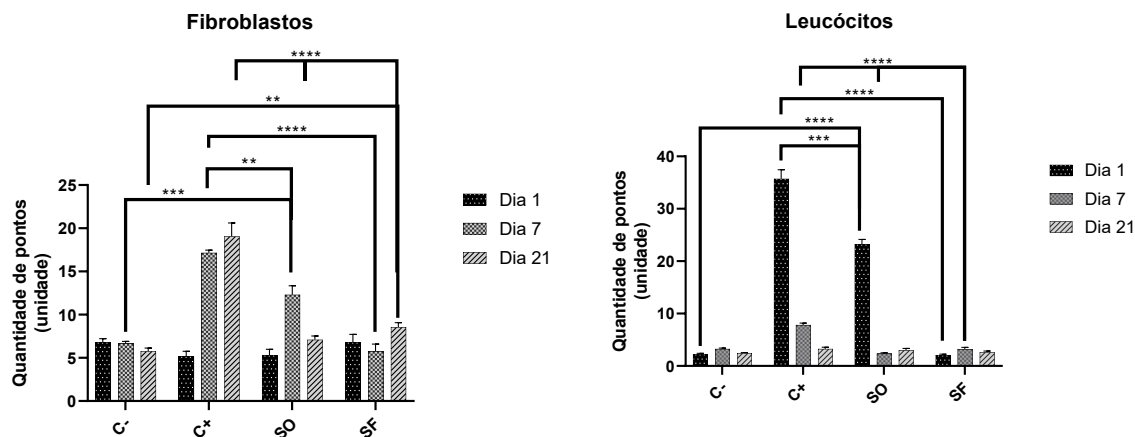
Fonte: A autora

Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 100X. Flecha azul indica o infiltrado inflamatório característico do C+ após um dia da aplicação. Flecha amarela indica células inflamatórias e edema presente na SE – SF.

A SO não apresentou faixa inflamatória característica presente no C+, e sim uma inflamação mais dispersa e não tão profunda quanto a FH, portanto o fenol sozinho não é capaz de causar grande inflamação para ser considerado um *peeling* profundo. Ao contabilizar a células inflamatórias nos tecidos, é possível observar essa

diferença (Gráfico 7), o C+ apresentou maior quantidade de leucócitos que as amostras testes.

Gráfico 7 - Contagem de fibroblastos e leucócitos nos diferentes dias estudados na Abordagem 2

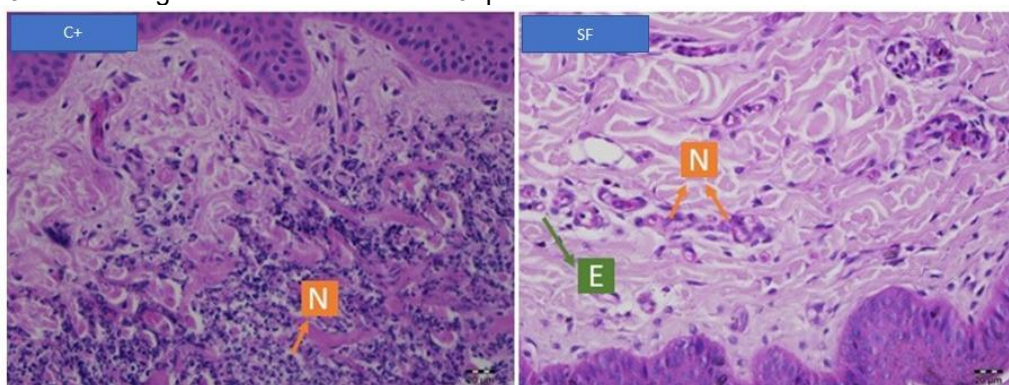


Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

O infiltrado inflamatório característico do C+ é predominante por neutrófilos que foi ocasionado provavelmente por uma alta concentração de substâncias pró-inflamatórias, entre elas encontra-se o forbol 12-miristato 13-acetato (FMA), isolado do OC e sua ação é justamente conhecida como ativador de neutrófilos, dado que são observados vários neutrófilos e edema próximo a epiderme na SF (Figura 23) (TAKEI *et al.*, 1996).

Figura 23 - Microfotografias das amostras 2 e 6 que mostram infiltrado inflamatório



Fonte: A autora

Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 400X. N – neutrófilos; E – edema

Os neutrófilos têm grande importância no desenvolvimento do processo inflamatório, pois segundo Yang *et al.* (2016) essas células desintegram sua membrana nuclear e a descondensação da cromatina, formam complexos com proteínas granulares e que possuem ação pró-inflamatória, conhecidos como NETs

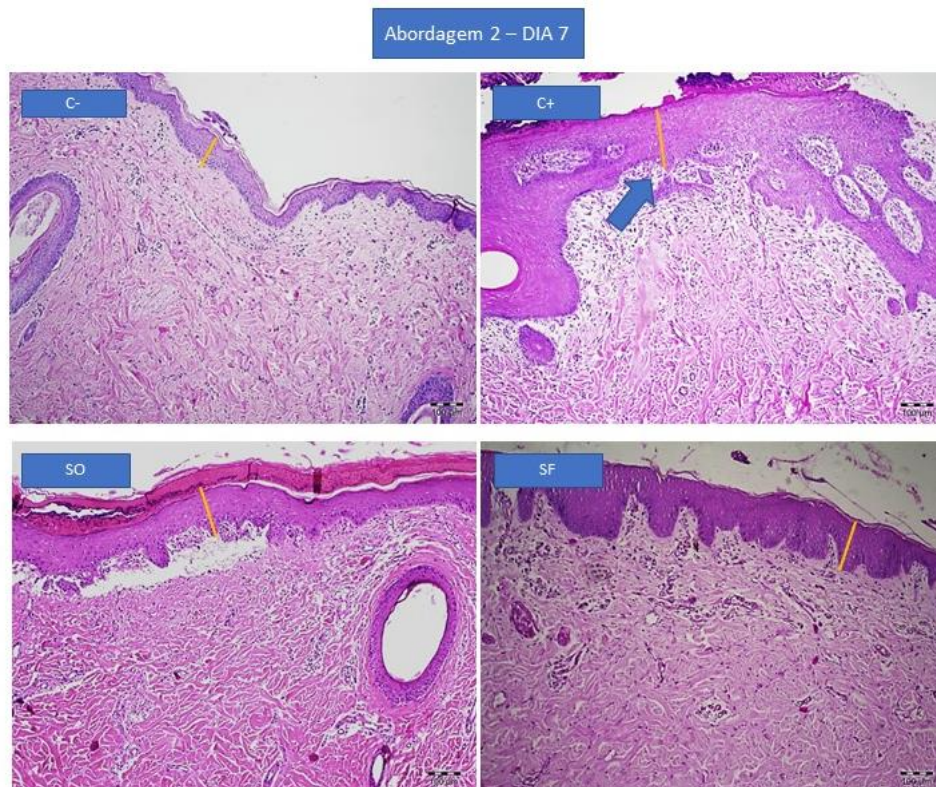


(*Neutrophils Extracellular Traps*), esses complexos ao serem liberados no meio extracelular formam teias, nas quais partículas estranhas podem se fixar. Em razão disso sugere-se que o *peeling* contendo o OC apresenta um processo inflamatório por tal via, já que o FMA comprovadamente apresenta essa ação e o *peeling* apenas com o fenol não apresenta tais características.

No 7º dia segundo, na Figura 24, o C+ apresenta uma epiderme muito espessa e considerada hiperplasia pseudoepiteliomatosa, cujos limites não são bem definidos e que se mesclam com a derme, o que não acontece com as outras amostras, apesar da SO apresentar um aumento na espessura da epiderme. Em relação aos elementos teciduais é visível a proliferação de fibroblastos no C+, porém não tão relevante nas demais amostras.

Para que ocorra a hiperplasia pseudoepiteliomatosa é necessário que muitas citocinas, que são liberadas pelas células inflamatórias, estimulem a proliferação das células epiteliais, portanto apenas o C+ apresentou uma reação inflamatória tão intensa a ponto de causar esse tipo de hiperplasia (Chauhan; Gupta; Chauhan, 2018).

Figura 24 - Microfotografias do 7º dia de biópsia após a aplicação das amostras da Abordagem 2



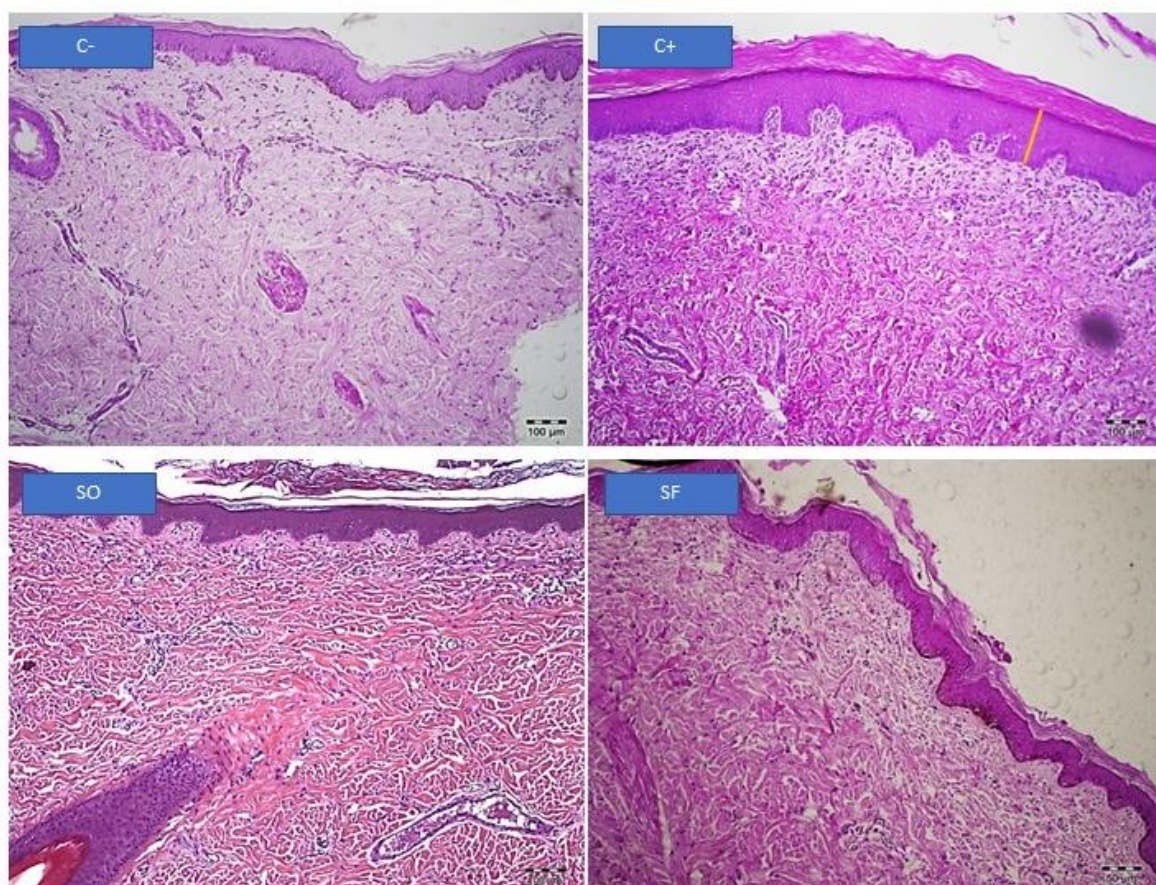
Fonte: A autora

Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 100X. Traço amarelo indica a espessura da epiderme. Flecha azul é indicativo da acantose presente no C+.

As microfotografias do 21º dia apresentadas na Figura 25 mostram que as SO e SF apresentam características semelhantes ao C- como indicado pelo Gráfico 6. A SO que apresentou leve lesão promoveu uma recuperação tecidual mais rápida, visto que o C+ ainda apresenta hiperplasia na sua epiderme, porém a epiderme está com seus limites bem definidos, denomina-se esse fato de acantose. O C+ também apresenta grande quantidade de fibroblastos na derme, reforçando que o *peeling* apenas com o fenol não é tão eficaz quanto ao associado com o OC.

Figura 25 - Microfotografias do 21º dia após a aplicação das amostras da Abordagem 2

Abordagem 2 – DIA 21



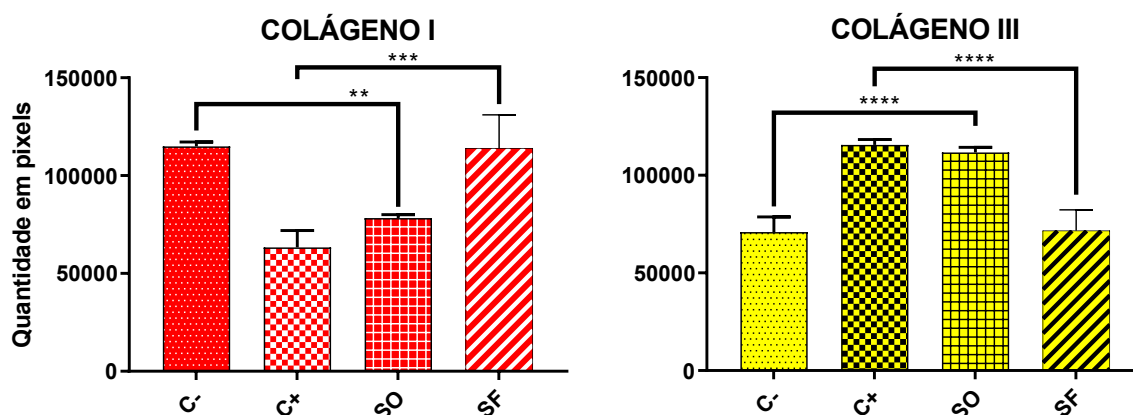
Fonte: A autora

Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 100X. C+ apresenta hiperplasia na epiderme conforme o traço amarelo indicado na figura.

Na análise com *Picrosirius Red* foram obtidos os resultados que estão definidos pelo Gráfico 8. Quanto a quantidade de colágeno tipo III a SO não apresentou diferença significativa comparado ao C+, portanto o *peeling* apenas com o fenol estimula a produção de colágeno, mesmo não causando uma inflamação tão intensa quanto a FH, e como esperado a SF não apresentou resultados significativos quanto a produção de colágeno III.



Gráfico 8 - Resultado da diferenciação de colágeno tipo I e tipo III para as amostras da Abordagem 2



Fonte: A autora (2023)

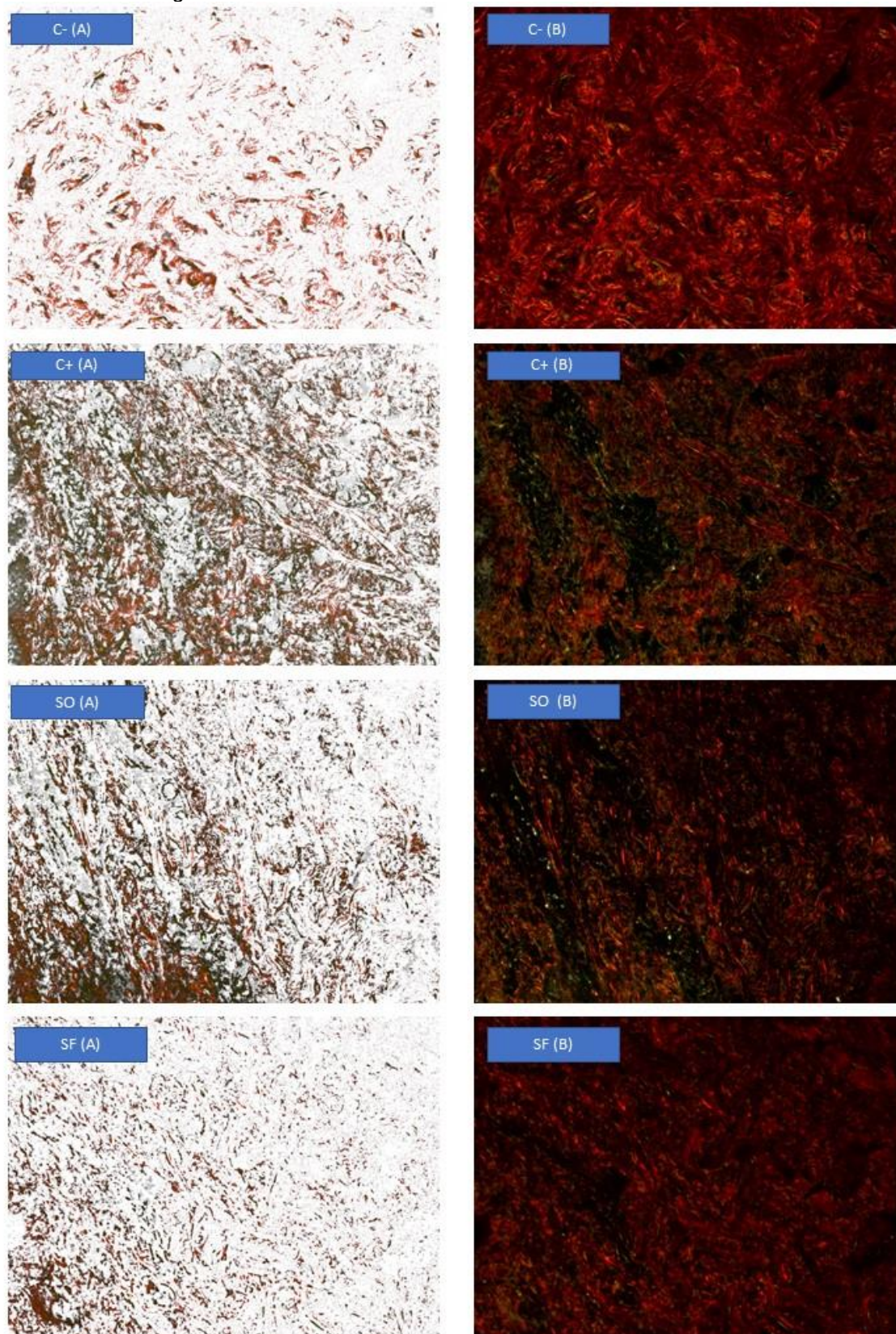
Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Na Figura 25 observa-se que a quantidade de colágeno tipo III na SO é maior que encontrada no C-, mas é menor se comparado com o C+, portanto sugere-se que o OC é um aliado ao fenol para obter um efeito melhor quanto a produção de colágeno.

Segundo Cardoso *et al.* (2022), a neocolagênese está relacionado as sirtuínas (SIRT), histonas que regulam produção de colágeno e modulam as ações dos fibroblastos, além de proteger contra danos externos, nesse estudo, observaram que após a aplicação da FH houve participação da SIRT-6 e SIRT-7 na neocolagênese através da técnica de imuno-histoquímica, foi observado também que houve um aumento considerável na quantidade de colágeno tipo III entre os dias 0 e 90 dias após a aplicação do *peeling*.

Apesar dos estudos realizados ainda se faz necessário a realização de outras técnicas que identifiquem e relacionem a ação do OC na FH e sua correlação com o processo inflamatório e a estimulação da produção de colágeno.

Figura 26 - Diferenciação de colágeno tipo I e tipo III através da coloração de *Picrosirius Red* das amostras das Abordagem 2



Fonte: A autora

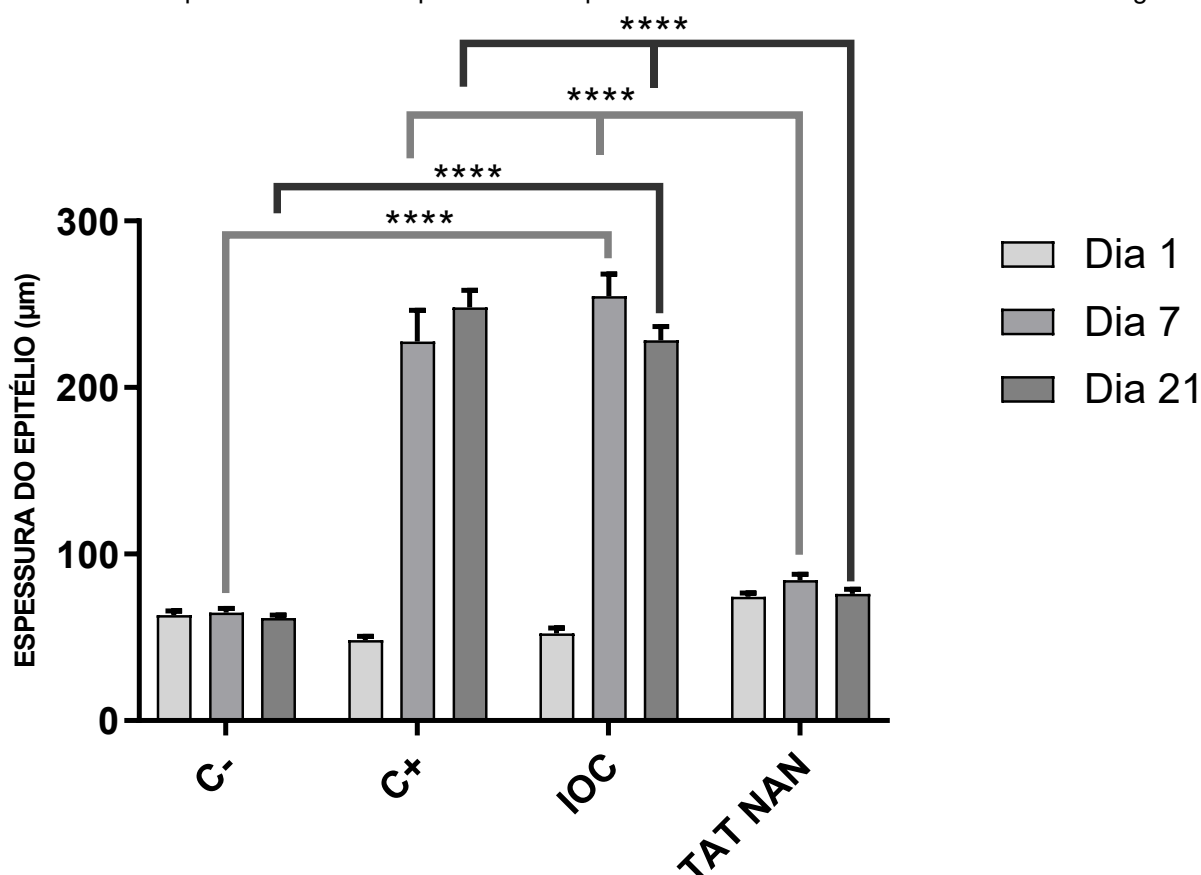
Nota: Coloração *Picrosirius Red*. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 200X. (A) – Fibras de colágeno tipo III isoladas das fotografias (B) para contagem dos pixels. (B) – Fotografia obtida das amostras coradas pela técnica.

### 5.3 ABORDAGEM 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DERMATOLÓGICOS DO ÓLEO DE CRÓTON (OC) POR MEIO DA APLICAÇÃO INTRADÉRMICA

Nessa abordagem foi avaliado a ação do OC isoladamente se aplicado diretamente na derme, com o auxílio de um dermatógrafo, sem a necessidade de uma formulação. Como controle negativo foi usado o nanquim que é uma tinta própria para a aplicação de tatuagens e que não promove irritação dérmica.

No Gráfico 9 evidentemente a IOC resultante da aplicação do OC pela via intradérmica, apresentou hiperplasia da epiderme para o dia 7 e 21 após a aplicação e que não é diferente estatisticamente do C+, resultado oposto da aplicação do nanquim (TAT NAN) que se comportou igualmente ao C- mesmo ocorrendo uma lesão resultante da aplicação intradérmica, semelhante a um procedimento de microagulhamento.

Gráfico 9 - Comparativo entre as espessuras da epiderme determinada nas amostras da Abordagem 3



Fonte: A autora

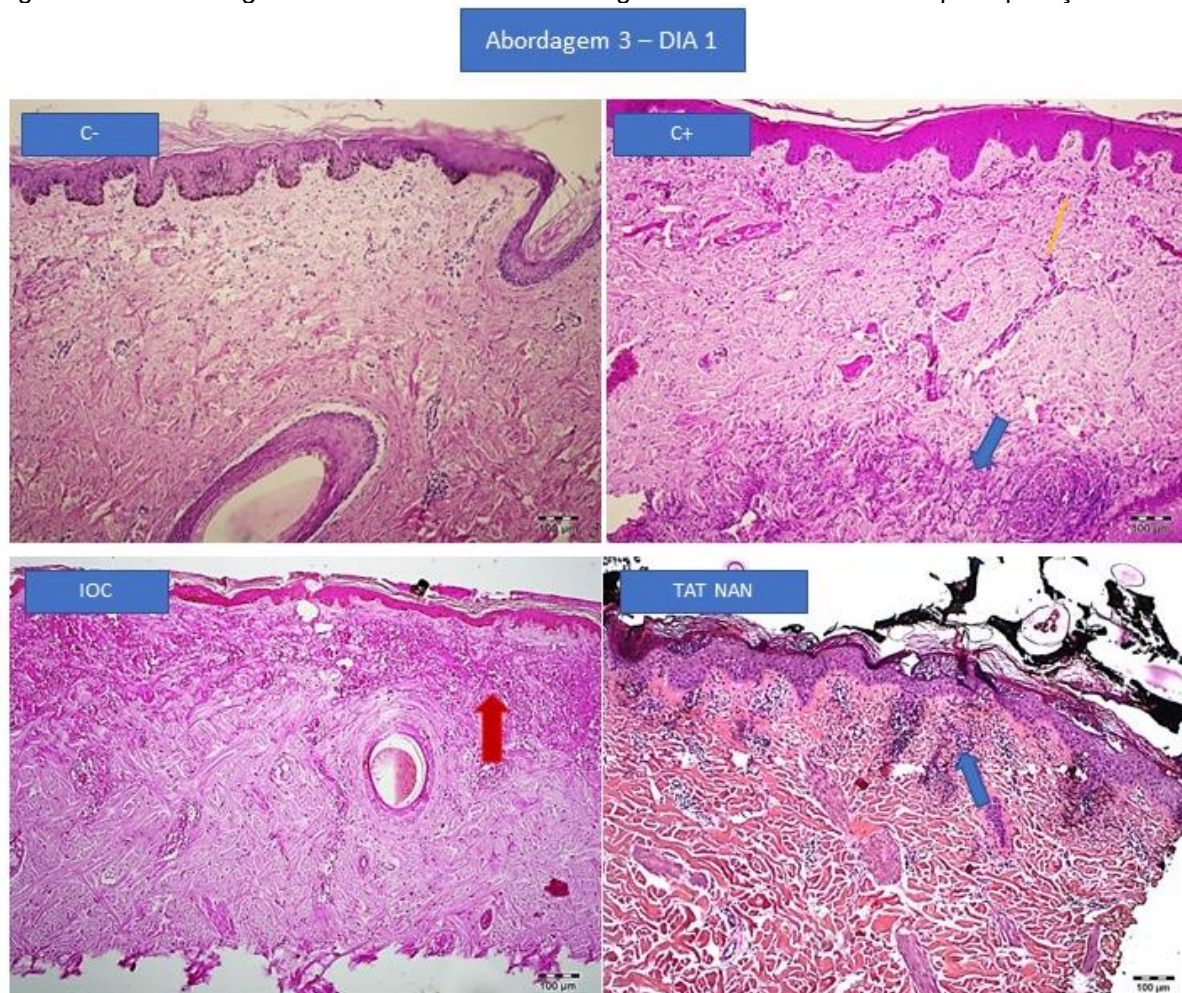
Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Em relação aos elementos teciduais no dia 1 é possível observar que ocorre um aumento de células significativo na aplicação do C+, como visualizado nas



abordagens anteriores (Gráfico 10). Na IOC, nota-se que há grande extravasamento de sangue no tecido, pois há muitas hemácias presentes. Em relação a TAT NAN há leve presença de células inflamatórias e resquícios da tinta aplicada (Figura 27).

Figura 27 - Microfotografias das amostras da abordagem 3 referente ao 1º dia após aplicação

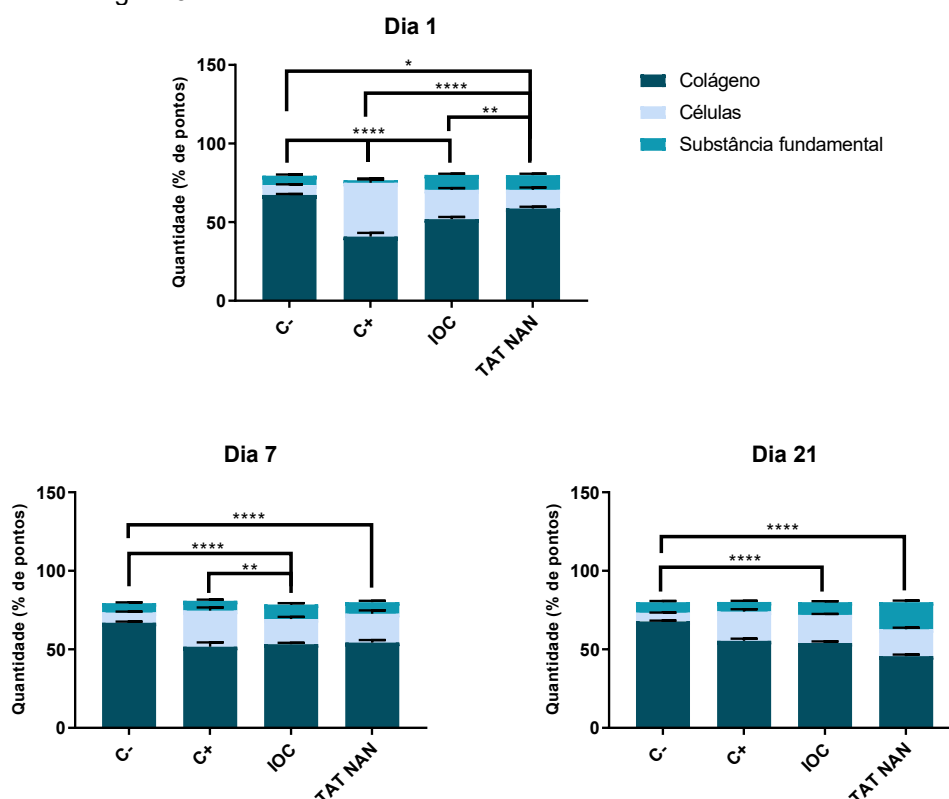


Fonte: A autora

Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 100X. Flecha azul indica o infiltrado inflamatório, na TAT NAN além de células inflamatórias foi observado resíduos da tinta aplicada; Flecha vermelha indica extravasamento de hemácias na IOC.

Quanto ao dia 7 a quantidade de células da IOC é diferente significativamente do C- e do C+, e a TAT NAN apresentou diferença apenas do C-. Mas nota-se que em ambas as amostras ocorreu um aumento no número de células, identificadas como fibroblastos devido a lesão causada e indicam a fase proliferativa (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Análise quanto a contagem dos elementos teciduais através da coloração HE para as amostras da Abordagem 3

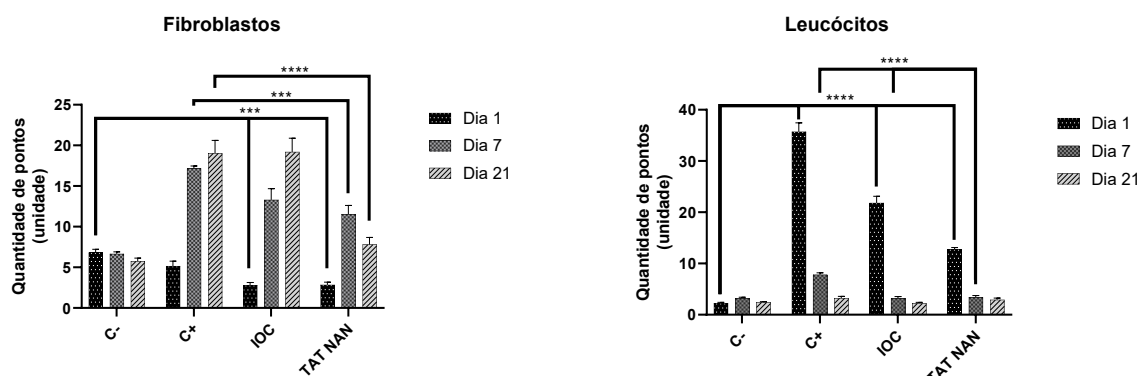


Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,0,5$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Para o dia 21, a quantidade de células para as amostras 7 e 8 é diferente significativamente apenas do C-. No Gráfico 11 é possível observar que a IOC apresentou o recrutamento de leucócitos no dia 1, porém não expressivo como o C+. A TAT NAN também favorece a inflamação aguda, mas menos intensa que as outras amostras. Em relação a quantidade de fibroblastos, apenas a IOC apresenta ativação de fibroblastos similar ao C+.

Gráfico 11 - Quantificação de células para as amostras avaliadas na Abordagem 3



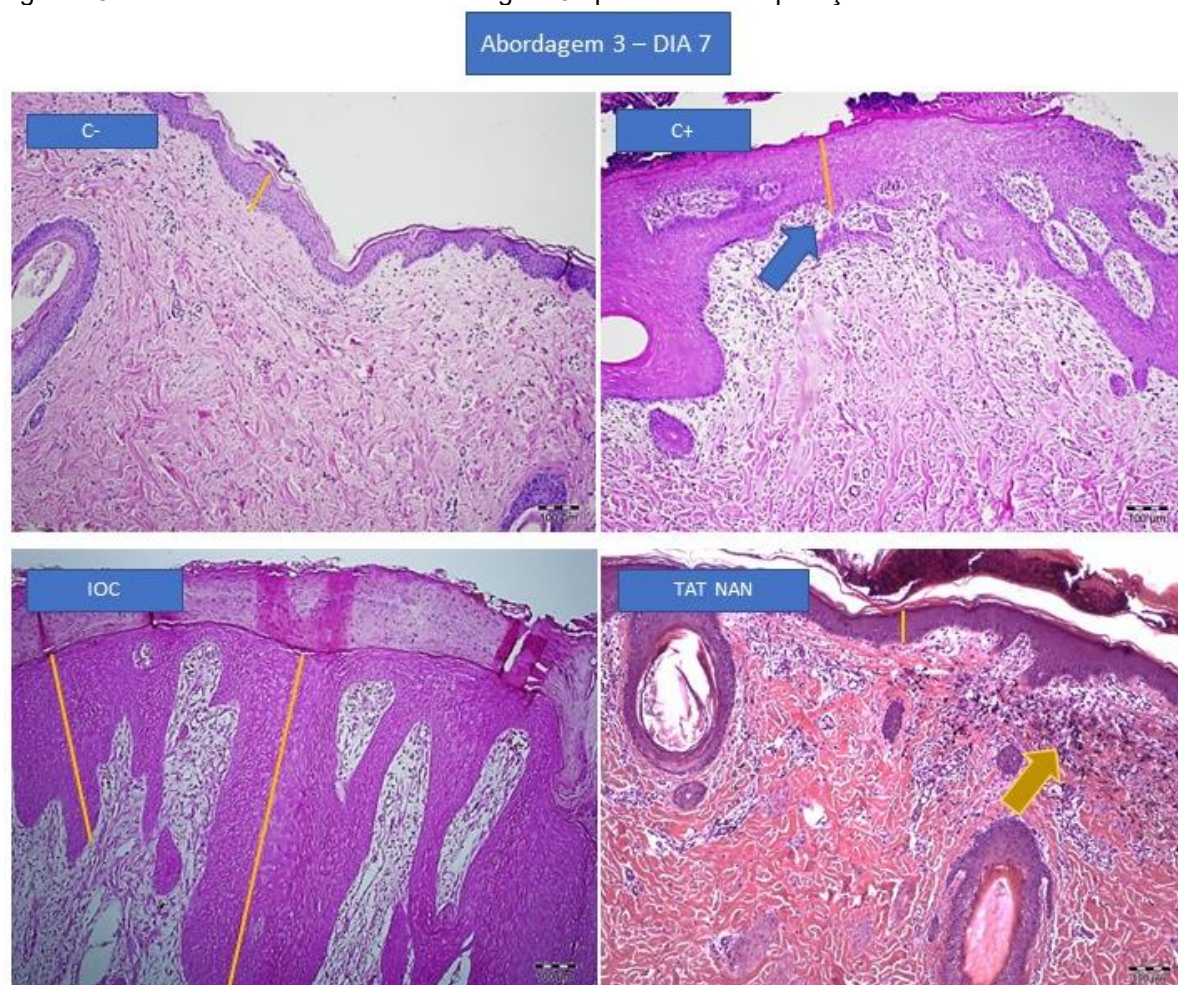
Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,0,5$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).



Quanto aos aspectos teciduais observados nas imagens obtidas, nota-se no dia 7, a hiperplasia pseudoepiteliomatosa (Figura 28) para a IOC é maior que o C+, indicando que a lesão causada pelo OC é mais intensa. Além da hiperplasia pseudoepiteliomatosa na IOC, observa-se um destacamento epidérmico muito espesso, que é o tecido lesionado e que precisou ser eliminado após o processo de recuperação tecidual, assemelhando-se mais aos efeitos causados pelo C+. Já para a TAT NAN, nota-se apenas resíduos da tinta aplicada e poucas alterações teciduais semelhante ao C-.

Figura 28 - Fotos das amostras da Abordagem 3 após 7 dias da aplicação



Fonte: A autora

Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 100X. Flecha amarela indica resíduos da tinta na TAT NAN; Traços amarelos demonstram a diferença da espessura da epiderme no tecido analisado.

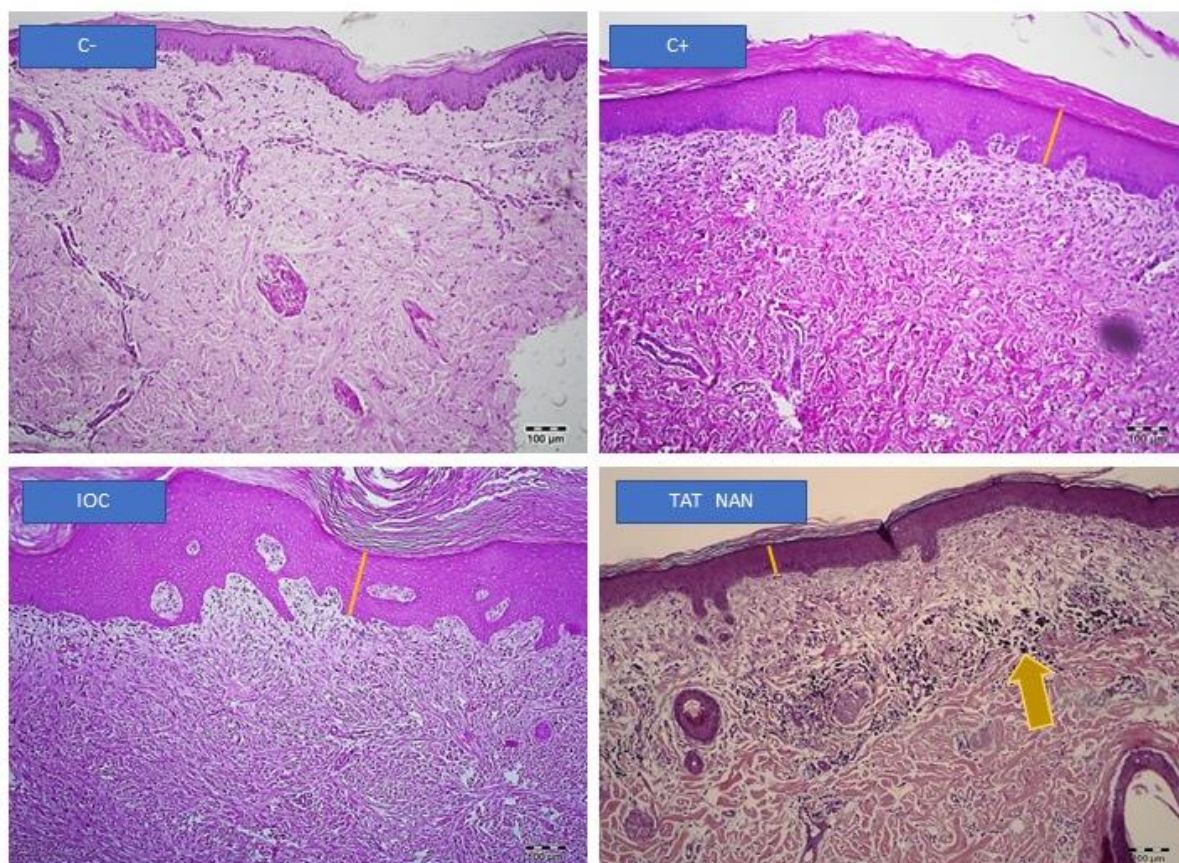
Na Figura 29 a IOC apresentou acantose e fibras de colágeno mais finas e bem dispersas e em alta densidade pela derme semelhante ao C+. Quanto as características histológicas da TAT NAN se assemelham mais ao C-, esses resultados indicam que muitos dos efeitos promovidos pela FH podem ser ocasionados pelo OC,



visto que as características histológicas são muito parecidas, porém até mais severos que a aplicação tópica da FH. Os fatores, como a lesão causada pelo dermatógrafo pode ter aumentado esses efeitos, porém ao analisar e comparar que a tinta de nanquim foi aplicada igualmente, pode considerar que as lesões causadas são do OC.

Figura 29 - Microfotografias correspondentes as amostras da Abordagem 3 após 21 dias da aplicação

Abordagem 3 – DIA 21



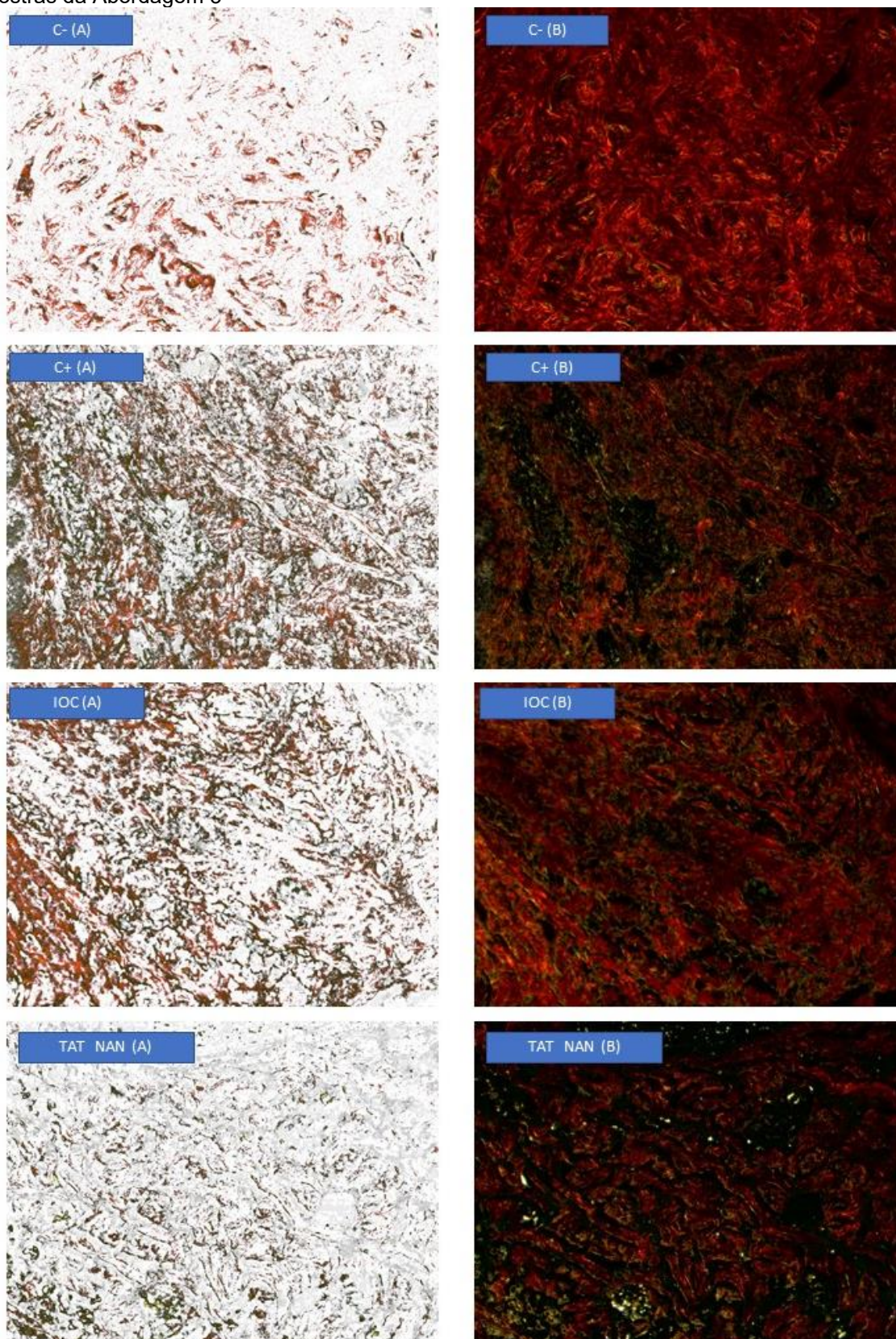
Fonte: A autora

Nota: Coloração HE. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 100X. Flecha amarela indica resíduos da tinta na TAT NAN; Traços amarelos demonstram a diferença da espessura da epiderme no tecido analisado.

Através da coloração de *Picrosirius Red* com a diferenciação de colágeno, é sugestivo que o OC é responsável pela neocolagênese, visto que apresentou resultados tal qual observados para o C+, e não há diferença significativa entre ambos. A TAT NAN também apresentou aumento de colágeno tipo III, porém em menor quantidade que o C+ e a IOC, como representados na Figura 29 e Gráfico 12.



Figura 30 - Imagens obtidas a partir da coloração de Picrosirius Red nas biópsias após a aplicação das amostras da Abordagem 3



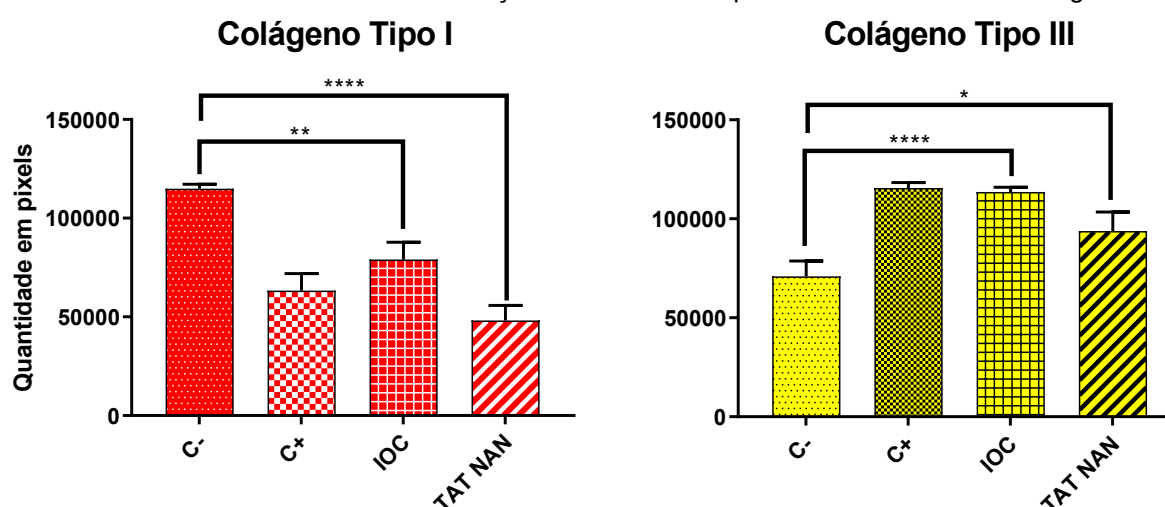
Fonte: A autora

Nota: Coloração *Picrosirius Red*. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 200X. (A) – Fibras de colágeno tipo III isoladas das fotografias (B) para contagem dos pixels. (B) – Fotografia obtida das amostras coradas pela técnica.



Nestas análises é possível identificar que o OC necessita de um meio de entrega no tecido a ser tratado, seja por formulação ou outros métodos de aplicação, portanto formulações que não facilitem sua permeação não permitirão seus efeitos promissores para produção de colágeno, algo que o fenol visivelmente proporciona, possivelmente por causar coagulação de proteínas além de solubilizar os forbóis que são os agentes potenciais pelos efeitos do OC (Justo *et al.*, 2020).

Gráfico 12 - Resultado da análise da coloração Picosirius Red para as amostras da Abordagem 3



Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

É importante considerar que a mudança da forma de administração, de tópica para intradérmica, possa causar absorção sistêmica. Até o momento não se tem estudos comprovando que o OC atinja níveis séricos quando aplicado topicamente. Entretanto, o fenol presente na fórmula de BG já foi detectado na urina após aplicação tópica (Kennedy, 1995; Pagani *et al.*, 2017).

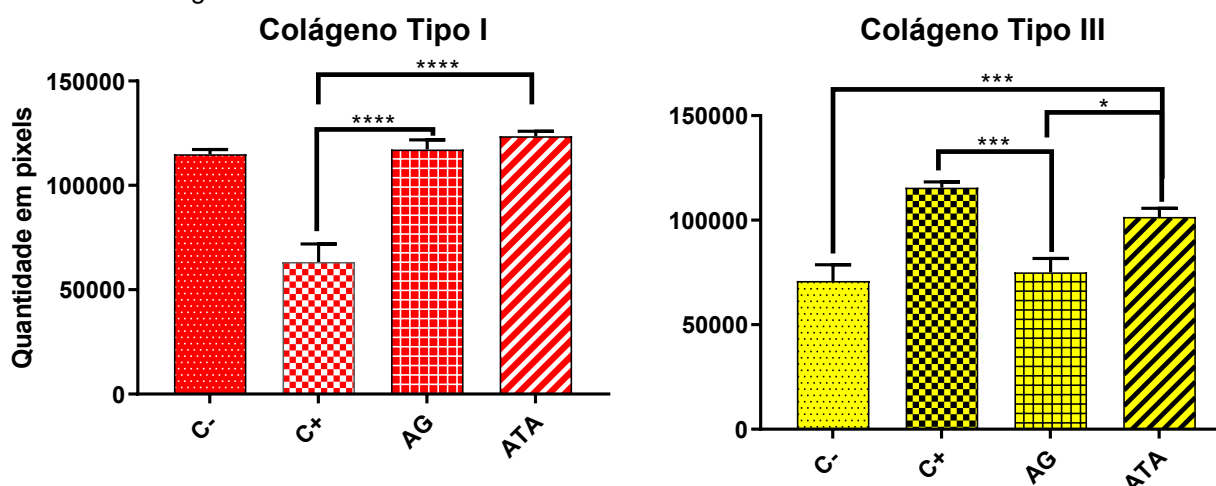
Em relação a fórmula de BG contendo fenol e OC, Kadunc e Vanti (2009) identificaram que após a administração tópica foi observado que o fenol atingiu picos urinários mais elevados que outras fórmulas contendo apenas fenol em concentrações mais baixas, indicando que sua absorção foi maior, e se manteve no organismo por até 48 horas após a aplicação. Foi observado que o pico mais alto de concentração de fenol no organismo se apresentou logo após a aplicação.

#### 5.4 ABORDAGEM 4 – COMPARAÇÃO ENTRE A FÓRMULA DE HETTER E FÓRMULAS CONTENDO ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (ATA) E ÁCIDO GLICÓLICO (AG)

Na abordagem 4 foi avaliado a produção de colágeno entre as amostras contendo fenol, ATA ou AG através da coloração de *Picrosirius Red*, visto que a avaliação de elementos teciduais no HE já foram realizadas por Lemes (2021).

Em relação a produção de colágeno é possível observar que a ATA, segundo o Gráfico 13, apresenta melhores resultados comparada a AG, essa amostra não se mostrou diferente estatisticamente do C- para a quantidade de ambos os tipos de colágeno. A ATA ao contrário é diferente significativamente do C- e da AG.

Gráfico 13 - Resultados da avaliação através da coloração de *Picrosirius Red* para as formulações contendo ácido glicólico e ácido tricloroacético



Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA múltiplas comparações com pós teste de Tukey -  $p < 0,0,5$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Na Figura 30 é possível observar que a amostra tratada com a fórmula contendo AG não possui densidade de colágeno tipo III significativa, aparentemente até menos que o C-. A fórmula contendo ATA se mostrou menos eficaz que o C+ mas com maior densidade de fibras de colágeno tipo III que AG.

Os resultados apresentados por Lemes (2021) permitem uma previsão para esses resultados obtidos, visto que a ATA no primeiro dia após a aplicação promoveu uma inflamação tão intensa quanto o C+, diferente da AG, que não apresentou diferença quanto ao número de células após 1 dia da aplicação.

O aumento da celularidade se estendeu até o dia 21 para a ATA, similar ao C+ segundo Lemes (2021), sendo essas células fibroblastos. Portanto nessa fase o tecido

está caminhando para sua recuperação e o processo inflamatório já foi reduzido significativamente.

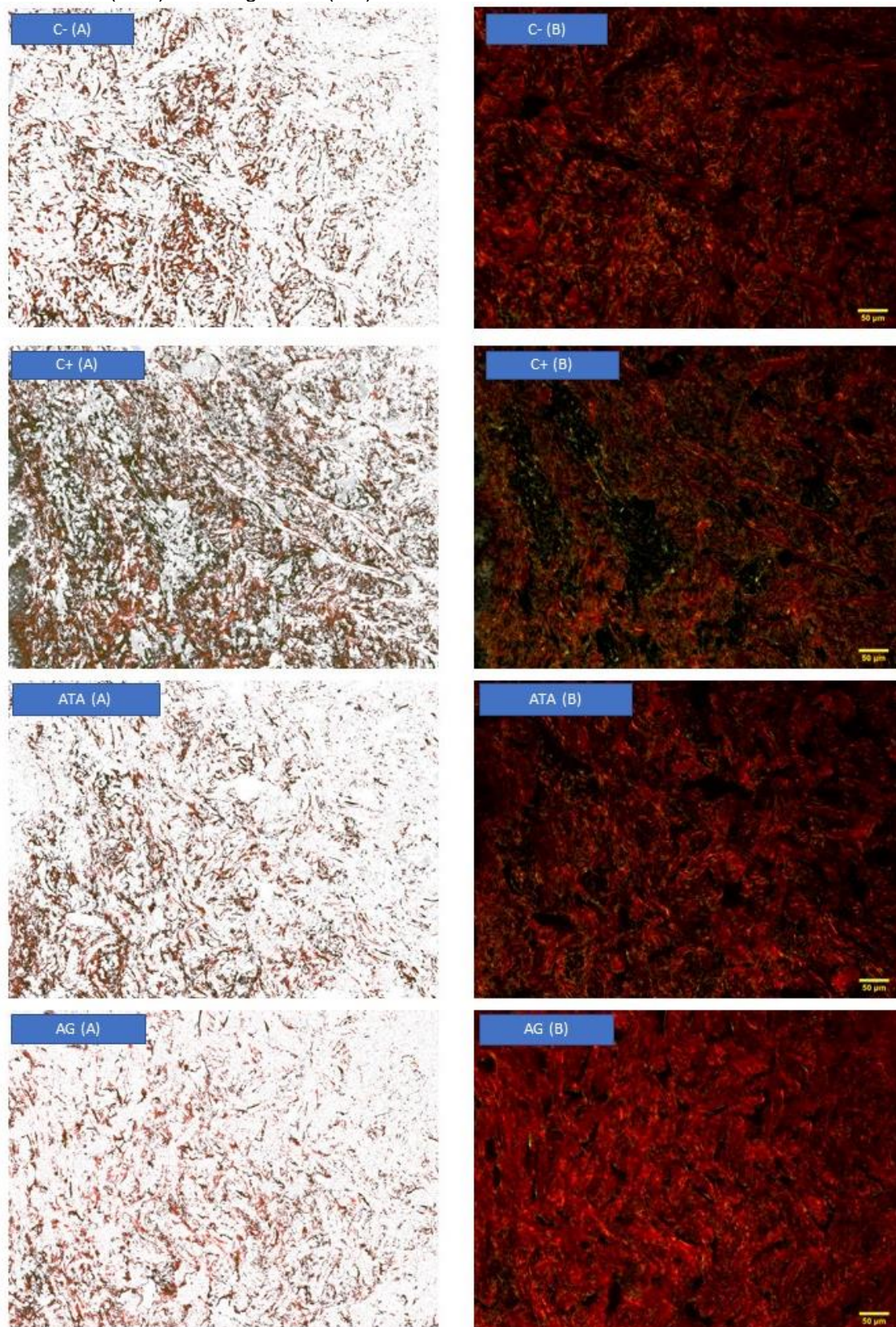
O pH das formulações foram medidos, a fórmula contendo ATA foi a mais ácida (pH 1,97), em seguida a fórmula com AG foi a segunda mais ácida (pH 2,55) em posteriormente a fórmula com fenol (pH 5,2). O ATA tem mecanismo de ação similar ao fenol, causa coagulação de proteínas, porém esse efeito pode dificultar sua permeação, necessitando aplicações sucessivas, como a técnica de aplicação para esse experimento foi definida e padronizada, não realizando uma segunda aplicação, os efeitos do ATA pode não ter apresentado tanto potencial quanto poderia (Lemes *et. al.*, 2022).

Vale ressaltar que as fórmulas usadas não são homogêneas por se tratar de análises prévias para outros projetos, sugerindo opções para formulações e possíveis substituintes para o fenol. O óleo, portanto, não estava distribuído uniformemente, mesmo homogeneizando antes da aplicação, a ação pode ser diferente de uma fórmula homogênea e tecnologicamente estável, mas das duas opções ao fenol, o ATA é o que apresenta melhor alternativa.

Comparando que o ATA possui um efeito de *peeling* mais profundo com concentrações acima de 50%, no atual estudo pode-se supor que o OC propiciou um maior efeito de *peeling*, já que na fórmula avaliada o ATA está a 35%. Porém a associação do OC com o AG não propiciou melhores resultados, talvez pois o AG é uma molécula maior que o ATA teria sua permeação dificultada. O pH que pode auxiliar a explicar os resultados observados, mas a concentração ideal para o AG promover um *peeling* mais profundo é a partir de 70% (Sampaio; Rivitti, 2007; Truchuelo; Cerdá; Fernández, 2016).



Figura 31 - Resultado da avaliação da presença de colágeno tipo III para a formulação contendo ácido tricloroacético (ATA) e ácido glicólico (AG)



Fonte: A autora

Nota: Coloração *Picosirius Red*. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 200X. (A) – Fibras de colágeno tipo III isoladas das fotografias (B) para contagem dos pixels. (B) – Fotografia obtida das amostras coradas pela técnica.

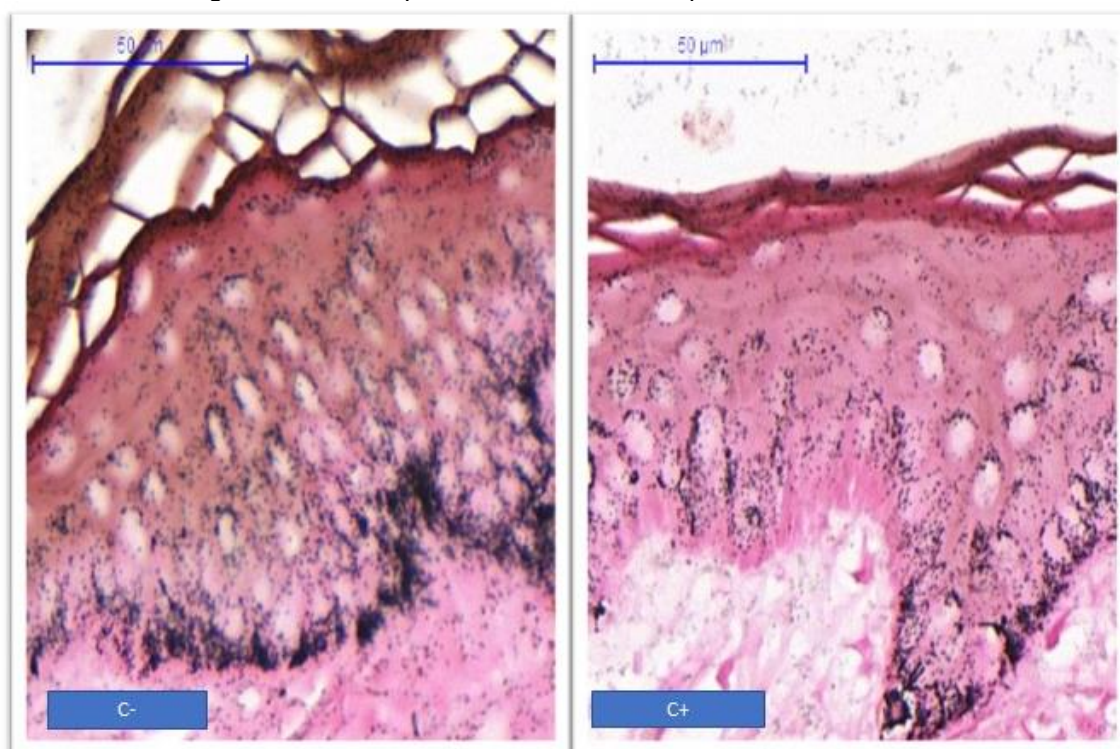


## 5.5 ABORDAGEM 5 – ANÁLISE DO EFEITO DO PEELING COM A FÓRMULA DE HETTER EM ANIMAIS DE PELAGEM ESCURA

A coloração de Fontana Masson é considerada o padrão-ouro para identificação de grânulos de melanina, o princípio da técnica está baseado na capacidade da melanina reduzir o nitrato de prata diamina em um precipitado negro (Joly-Tonetti *et al.*, 2016).

A técnica foi escolhida para visualizar os resultados obtidos para as amostras tratadas com o C- e C+ para as biópsias do dia 21, no qual o tecido já está praticamente recuperado e verificar se o processo de *peeling* degradou melanócitos reduzindo, portanto, a produção de melanina, já que estudos não foram realizados nesse sentido (Figura 32).

Figura 32 - Microfotografias obtidas após o tecido ser corado pela técnica de Fontana Masson

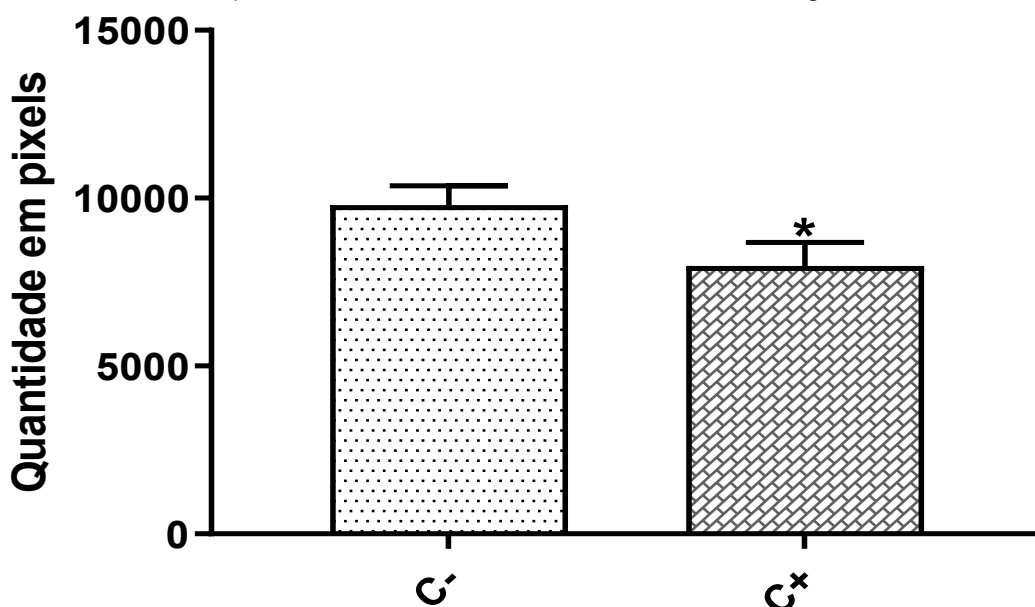


Fonte: A autora

Nota: Coloração Fontana Masson. Microfotografias tiradas com uma ampliação de 200X. Pontos negros: melanina.

Como observado na Figura 32, após a aplicação do *peeling* da FH, observa-se que a quantidade de melanina reduziu consideravelmente, e essa redução foi confirmada pela contagem de pixels após isolamento da coloração negra. O C+ apresentou diferença significativa do C- quanto a quantidade de melanina no tecido (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Resultado da quantidade de melanina nas amostras da Abordagem 5



Fonte: A autora

Nota: Análise estatística por Teste T -  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Segundo a escala de Fitzpatrick, método utilizado para identificar o fototipo da pele conforme a sensibilidade aos raios UV. Quanto maior o grau, mais facilidade ao bronzeamento a pessoa apresenta, portanto maior a quantidade de melanina na pele. Para evitar intercorrências, alguns tipos de *peelings* não são indicados para peles de fototipos IV a VI segundo a escala, pois conforme a prática clínica alguns *peelings* reduzem o tom natural da pele, além disso, se a pele não for cuidada adequadamente após o procedimento os melanócitos podem gerar hiperpigmentação (Bieliauskiene *et al.*, 2020; Vasconcelos *et al.*, 2013).

Com esses resultados pode-se sugerir que a FH não é aconselhada para fototipos IV a VI, porém é necessários estudos posteriores, talvez avaliar após 30 dias verificando se a quantidade de melanina retorna à normalidade.

Segundo Salam, Dadzie e Galadari (2013) o *peeling* de fenol com OC não é indicado para fototipos IV-VI por causar hipopigmentação, os *peelings* mais indicados para esses fototipos são os de até média profundidade utilizando ATA ou AG em concentrações mais baixas, porém o combate a rugas e linhas de expressão profundas é menor. Estudos posteriores podem avaliar se a hipopigmentação está relacionada com a ação do óleo de croton.

## 6 CONCLUSÃO

Esse estudo abrangeu cinco abordagens diferentes que permitiram avaliar a ação do OC em diferentes formulações e compreender melhor o objetivo de sua incorporação em formulações para *peeling*.

Na abordagem 1, complementando estudos sobre estabilidade química do OC após aberto e armazenado por 3 meses e que ocorre degradação progressiva de certos componentes, observou-se na ação biológica, a falta de estabilidade pode interferir, pois a biópsia tratada com FH preparada utilizando a solução estoque que foi armazenada por 3 meses não apresentou resultados tão bons quanto a amostra que recebeu a aplicação da FH utilizando uma solução estoque recém-preparada, juntamente nesse estudo, observou-se que a SE por apresentar maior quantidade de fenol e OC teoricamente poderia apresentar um processo inflamatório mais intenso, o que não aconteceu, sugerindo portanto que o efeito desses compostos não são concentração dependente.

Na Abordagem 2 foi possível compreender que a formulação apenas com o fenol não proporciona um efeito pró-inflamatório tão intenso quanto a fórmula de fenol associado ao OC, e essa intensidade inflamatória está relacionada diretamente com a produção de colágeno tipo III, quanto maior a inflamação, mais colágeno será produzido. Em contrapartida se o OC não tiver algum auxiliar de permeação os compostos bioativos não permeiam a pele tão profundamente, efeito observado nas amostras que receberam a aplicação tópica do OC. O fenol auxilia essa permeação, pois a partir do momento que é aplicado através da sua ação de desnaturação proteica, ocorre a desestruturação tecidual, abrindo caminhos e auxiliando na entrada dos componentes ativos presentes no óleo.

Complementando esses resultados através da abordagem 3, com a aplicação do OC diretamente na derme através da técnica intradérmica, nas amostras é possível observar que ocorreu um processo inflamatório muito intenso com características semelhantes ao observado na aplicação da FH de forma tópica, diferente do observado com a substância inerte (nanquim) aplicado igualmente ao OC. Com esses resultados confirma-se que é necessário algum método para auxiliar na permeação e carreamento dos compostos bioativos do OC na pele de forma mais profunda para se obter ação similar a FH.

Ao avaliar pela abordagem 4 os possíveis substituintes do fenol na formulação através da produção de colágeno tipo III, observa-se que o ATA seria o possível substituinte, mas é importante realizar outros estudos testando várias concentrações e aplicações, visto que conforme o ATA desnatura proteínas ele é neutralizado e não permeia camadas mais profundas, portanto sua ação está relacionada diretamente com a concentração e com a quantidade de aplicações.

A fim de comprovar de forma científica a restrição do *peeling* de Hetter para fototipos de pele IV-VI segundo a escala de Fitzpatrick, foi realizada a abordagem 5 verificando o comportamento da FH em pele com grande quantidade de melanina, e observou-se que ocorreu uma redução significativa de melanina, ou seja, causou hipocromia, comparando com o C-, porém esses resultados não podem ser definitivos, um estudo avaliando a variação do tempo seria importante para verificar se ocorreu morte de melanócitos e se o tecido consegue repor essa melanina com o decorrer do tempo, além disso é válido averiguar se o OC tem correlação com essa ação.

Com todo o trabalho desenvolvido foi obtido grandes resultados, visto que desde a década de 60 não se compreendia a importância desse produto natural em um *peeling*, entendia-se que esse óleo era apenas um auxiliar de permeação. Com os últimos estudos realizados é possível definir que o óleo tem grande poder inflamatório no *peeling* e com isso estimula a produção de colágeno e traz o rejuvenescimento esperado, porém se faz necessário estudos mais profundos para compreender os mecanismos de ação e desenvolvimentos de fórmulas mais seguras para a realização do *peeling*.



## REFERÊNCIAS

- ALVES, R. R.; ROSA, I. L. Why study the use of animal products in traditional medicines? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, n. 1, p. 5, 2005.
- ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010.
- AREZZO, J. C. Possible mechanisms for the effects of botulinum toxin on pain. **Clinical Journal of Pain**, v. 18, n. 6, 2002.
- ASGARI, M.; LATIFI, N.; HERIS, H. K.; VALI, H.; MONGEAU, L. In vitro fibrillogenesis of tropocollagen type III in collagen type I affects its relative fibrillar topology and mechanics. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- AZULAY, R. D. **Dermatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: 2015.
- BAKER, T. J. Chemical face *peeling* and rhytidectomy: A combined approach for facial rejuvenation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 29, n. 2, p. 199–207, 1962.
- BASTIANETTO, S.; BASTIANETTO, S.; DUMONT, Y.; DURANTON, A.; VERCAUTEREN, F.; BRETON, L.; QUIRION, R. Protective Action of Resveratrol in Human Skin: Possible Involvement of Specific Receptor Binding Sites. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 12935, 2010.
- BELDA JUNIOR, W.; CHIACCHIO, N.; CRIADO, P. R. **Tratado de dermatologia**. 2, v.2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 1537–2691, 2014.
- BERTOSSI, D.; BERTOSSI, D.; GIAMPAOLI, G.; LUCCHESI, A.; MANUELLI, M.; ALBANESE, M.; NOCINI, R.; NOCINI, P. F. The skin rejuvenation associated treatment—Fraxel laser, Microbotox, and low G prime hyaluronic acid: preliminary results. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 7, p. 1449–1455, 2019.
- BIELIAUSKIENE, G.; HOLM-SCHOU, A. S.; PHILIPSEN, P. A.; MURPHY, G. M.; SBOUKIS, D.; SCHWARZ, T.; YOUNG, A. R.; WULF, H. C. Measurements of sun sensitivity in five European countries confirm the relative nature of Fitzpatrick skin phototype scale. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 36, n. 3, p. 179–184, 2020.
- BLUMBERG, P. M. Protein Kinase C as the Receptor for the Phorbol Ester Tumor Promoters: Sixth Rhoads Memorial Award Lecture. **Cancer Research**, v. 48, n. 1, p. 1–8, 1986.
- BOOMI, P.; POORANI, G. P.; SELVAM, S.; PALANISAMY, S.; JEGATHEESWARAN, S.; ANAND, K.; BALAKUMAR, C.; PREMKUMAR, K.; PRABU, H. G. Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Croton sparsiflorus* leaves extract and evaluation of UV protection, antibacterial and anticancer applications. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 34, n. 5, p. 1097–1102, 2020.
- BRIN, M. F.; HALLETT, M.; JANKOVIC, J. **Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin**. 2002.

BROWN, A. M. **Skin treating method and composition**, 1959. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US3067106>. Acesso em: 25 abr. 2022.

BROWN, A. M.; KAPLAN, L. M., BROWN, M. E. Phenol-induced histological skin changes: Hazards, technique, and uses. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 13, n. 3, p. 158-169, 1960.

CARDOSO, F. A. M. S.; MOURA, R. D.; PILAR, E. F. S.; MOURA, I. C. G.; MIOT, H. A.; COSTA, A. Phenol–croton oil peel enhances type-1 and type-3 collagen amounts by stimulating SIRT-6 and SIRT-7. **International Journal of Dermatology**, v. 61, n. 2, 2022.

CHAUHAN, A.; GUPTA, L.; CHAUHAN, S. Pseudoepitheliomatous hyperplasia: A diagnostic dilemma. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v. 39, n. 1, p. 114–116, 2018.

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**, v. 234, p. 439–444, 2017.

CHUNG, J. H.; EUN, H. C. Angiogenesis in skin aging and photoaging. **Journal of Dermatology**, v. 34, p. 469–474, 2007.

DAVIS, K. L.; BURNUM, A. L.; BECK, J. A.; KIREJCZYK, S. G. M.; MILLER, M. A.; SOLA, M. F.; BROWN, C. A. Diagnosis of Collagen Type III Glomerulopathy Using *Picrosirius Red* and PASH/Masson’s Trichrome Stain. **Veterinary Pathology**, v. 57, n. 5, p. 675–680, 2020.

DAYAL, S.; AMRANI, A.; SAHU, P.; JAIN, V. K. Jessner’s solution vs. 30% salicylic acid peels: a comparative study of the efficacy and safety in mild-to-moderate acne vulgaris. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 16, n. 1, p. 43–51, 2017.

DEVLIN, H. R.; HARRIS, I. J. Mechanism of the oxidation of aqueous phenol with dissolved oxygen. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals**, v. 23, n. 4, p. 387–392, 1984.

EZEMMA, O. *Croton tiglium* oil is responsible for the intense inflammation and deep neocollagenesis in Hetter’s phenol-croton oil chemical peel. **Mendeley**, v. 2, 2020.

FARAGE, M. A; MILLER, K. W.; ELSNER, P.; MAIBACH, H. I. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 2, p. 87–95, 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**, v. 24, n. 3, p. 281–292, 2010.

FISHER, G. J.; VARANI, J.; VOORHEES, J. J. Looking Older: Fibroblast Collapse and Therapeutic Implications. **Archives of Dermatology**, v. 144, n. 5, p. 666–672, 2008.

FU, R.; CHEN, F.; GUO, Y. Anti-inflammatory mechanism and active ingredients of the Chinese tallow tree. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, p. 112497, 2020.

GABBIANI, G.; HIRSCHL, B. J.; RYAN, G. B.; STATKOV, P. R.; MAJNO, G. Granulation tissue as a contractile organ. **Journal of Experimental Medicine**, v. 135, n. 4, p. 719–734, 1972.

GANCEVICIENE, R.; LIAKOU, A. I.; THEODORIDIS, A.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. Skin anti-aging strategies. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, 2012.

GERVÁSIO, C. F. N. Uso De Plantas Mediciniais E De Fitoterápicos Na Disfunção Estética Fibro Edema Gelóide (Feg). **RCMOS - Revista Científica Multidisciplinar O Saber**, v. 3, n. 3, p. 01–17, 2021.

GILCHREST, B. A.; KRUTMANN, J. **Skin Aging**. 1. ed. [s.l.] Springer, 2010.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Porto Alegre, RS: AMGH, 2012.

GUENTHER, F.; MAUS, D.; HEDTRICH, S.; MELZIG, M. F. Serine Protease Mauritanicin from *Euphorbia mauritanica* and Phorbol-12-myristate-13-acetate Modulate the IL-8 Release in Fibroblasts and HaCaT Keratinocytes. **Planta Médica**, v. 85, n. 7, p. 578–582, 2019.

HE, Q.; ZHANG, L.; LI, T.; LI, C.; SONG, H.; FAN, P. Genus *Sapium* (Euphorbiaceae): A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 277, 2021.

HETTER, G. An Examination of the Phenol Croton Oil Peel: Part I. Dissecting the Formula. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 105, n. 1, p. 227–239, 2000a.

HETTER, G. P. An examination of the phenol-croton oil peel: Part II. The lay peelers and their croton oil formulas. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 105, n. 1, p. 240–251, 2000b.

HETTER, G. P. An examination of the phenol-croton oil peel: Part III. The plastic surgeons' role. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 105, n. 2, p. 752–763, 2000c.

HETTER, G. P. An examination of the phenol-croton oil peel: part IV. Face peel results with different concentrations of phenol and croton oil. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 105, n. 3, p. 1061–1067, 2000d.

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**, v. 11, n. 2, p. 103–112, 2010.

HORINOUCI, C. D. S.; MENDES, D. A. G. B.; SOLEY, B. S.; PIETROVSKI, E. F.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): Potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 311–319, 2013.

HU, J.; GAO, W. Y. MA, L.; MAN, S. L.; HUANG, L. Q.; LIU, C. X. Activation of M3 muscarinic receptor and Ca<sup>2+</sup> influx by crude fraction from *Crotonis Fructus* in isolated rabbit jejunum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 136-141, 2012.

IOSIFIDIS, C.; GOUTOS, I. Percutaneous collagen induction (microneedling) for the management of non-atrophic scars: literature review. **Scars, Burns & Healing**, v. 5, p. 205951311988030, 2019.

JOLY-TONETTI, N.; WIBAWA, J. I. D.; BELL, M.; TOBIN, D. Melanin fate in the human epidermis: a reassessment of how best to detect and analyse histologically. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 7, p. 501–504, 2016.

JUSTO, A. da S. **Caracterização química do óleo de *Croton tiglium* (Euphorbiaceae) e avaliação do perfil dermatológico do *peeling* de fenol com óleo de croton**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.

JUSTO, A. S.; LEMES, B. M.; NUNES, B.; ANTUNES, K. A.; CAPOTE, A. C. M.O.; LIPINSKI, L. C.; CAMPAGNOLI, E. B.; EMILIANO, J.; MEURER, E. C.; EZEMMA, O.; MIOT, H. A.; BELTRAME, F. L.; WAMBIER, C. G. Characterization of the Activity of *Croton tiglium* Oil in Hetter's Very heavy Phenol-Croton Oil Chemical Peels. **Dermatologic Surgery**, v. 47, n. 7, p. 944–946, 2021.

JUSTO, A. S.; LEMES, B. M.; NUNES, B.; ANTUNES, K. A.; CARLETTO, B.; KOGA, A. Y.; LIPINSKI, L. C.; MONTEMOR NETTO, M. R.; CAMPAGNOLI, E. B.; BELTRAME, F. L.; WAMBIER, C. G. Depth of injury of Hetter's phenol-croton oil chemical peel fórmula using 2 different emulsifying agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 82, n. 6, p. 1544–1546, 2020.

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

KASS, L. G.; RULLAN, P. P.; BRODY, H. J. Clinical preliminary evaluation of PEG-80 sorbitan laurate (Novisol) versus sodium C14-16 olefin sulfonate & triclosan (Septisol) in deep-*peeling* Hetter formulas. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 82, n. 6, p. e255–e256, 2020.

KAUR, A.; GARG, N. K. Medicinal Uses of Jayapala (*Croton tiglium* Linn): A Review Article. **World Journal of pharmaceutical and medical research**, v. 5, n. 10, p. 58–59, 2019.

KENNEDY, A. R. Effects of the 6 $\beta$ -7 $\beta$ -epoxide of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on radiation transformation in vitro. **Cancer Letters**, v. 95, n. 1–2, p. 7–9, 1995.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Robbins & Cotran bases patológicas das doenças. In: **Robbins & Cotran bases patológicas das doenças**. 2010. p. 1458-1458.

LANDAU, M. Cardiac complications in deep chemical peels. **Dermatologic Surgery**, v. 33, n. 2, p. 190–193, 2007.

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

LEITE, B. **Peeling químico no tratamento do envelhecimento facial – revisão integrativa**. 2021. 1–18f. UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina, 2021.

LEMES, B. M. **Explorando novas possibilidades de formulações a partir do peeling de fenol com óleo de *Croton tiglium* (fórmula de Hetter)**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2021.

LEMES, B. M.; JUSTO, A. S.; LIN, E. M.; CAPOTE, A. C. M.O.; NEVES, A. K. L.; MACHINSKI, I.; PEREIRA, A. V.; KOGA, A. Y.; LIPINSKI, L. C.; BELTRAME, F. L. WAMBIER, C. G. The effects of 35% trichloroacetic acid-Croton oil and 35% glycolic acid-Croton oil compared to 35% phenol-Croton oil Hetter's very heavy formula for deep chemical peel. **Journal of the American Academy Of Dermatology**, v. 87, n. 5, p. 1227-1229, 2022.

LI, C.; WU, X.; SUN, R.; ZHAO, P.; LIU, F.; ZHANG, C. *Croton tiglium* Extract Induces Apoptosis via Bax/Bcl-2 Pathways in Human Lung Cancer A549 Cells. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 11, p. 4893–4898, 2016.

LINTNER, K.; MAS-CHAMBERLIN, C.; MONDON, P.; PESCHARD, O.; LAMY, L. Cosmeceuticals and active ingredients. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 461–468, 2009.

LITJENS, S. H. M.; PEREDA, J. M.; SONNENBERG, A. Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 376–383, 2006.

LUO, H.; LV, X.; WANG, G.; LI, Y.; KURIHARA, H.; HE, R. Anti-inflammatory effects of anthocyanins-rich extract from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on croton oil-induced ear edema and *Propionibacterium acnes* plus LPS-induced liver damage in mice. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, n. 5, p. 594–601, 2014.

MEENA, A. K.; VENKATARAMAN, P.; SINGH, R.; GANJI, K.; KRISHNA, M. N. S. Evaluation of the role of Shodhana (Purification) process in *Croton tiglium* seeds for reduction of toxic content. **International Journal of Ayurvedic Medicine**, v. 12, n. 3, p. 565–575, 2021.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257–262, 2009.

MITRA, S. K.; DATTA, H. S.; PARAMESH, R.; PATWARDHAN, B. Theories and management of aging: Modern and ayurveda perspectives. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

MOUDGIL, K. D.; KHALIL, A. A. The 1st Euro-Mediterranean Workshop: Natural Products in Health and Diseases: Cairo, Egypt, March 2, 2015. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 292–296, 2016.

NIU, Q. L.; SUN, H.; LIU, C.; LI, J.; LIANG, C. X.; ZHANG, R. R.; GE, F. R.; LIU, W. *Croton tiglium* essential oil compounds have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in A549 lung cancer cell lines. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, p. 1–16, 2020.



O'CONNOR, A. A.; LOWE, P. M.; SHUMACK, S.; LIM, A.C. Chemical peels: A review of current practice. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 59, n. 3, p. 171–181, 2018.

OLIVEIRA, G. C. DE; PEREIRA, G. G.; CERRI, M. F. Aplicabilidade dos *peelings* químicos. **Revista Acadêmica: Novo Milênio**, v. 3, n. 4, p. 1–17, 2021.

PADILLA-CAMBEROS, E.; TORRES-GONZALEZ, O. R.; SANCHEZ; HERNANDEZ, I. M.; DIAZ-MARTINEZ, N. E.; HERNANDEZ-PEREZ, O. R.; FLORES; FERNANDEZ, J. M. Anti-Inflammatory Activity of *Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) Ethyl Acetate Extract on Croton Oil-Induced Mouse Ear Edema. **Applied Sciences**, v. 11, n. 20, p. 9697, 2021.

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**, v. 13, p. 1361–1367, 2017.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v. 187, n. 5 SUPPL. 1, p. S11–S16, 2004.

PEREIRA, U.; GARCIA-LE GAL, C.; LE GAL, G.; BOULAIS, N.; LEBONVALLET, N.; DORANGE, G.; LEFEUVRE, L.; GOUGEROT, A.; MISERY, L. Effects of *sangre de drago* in an in vitro model of cutaneous neurogenic inflammation. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 9, p. 796–799, 2010.

PILIPOVIC, S.; MULABEGOVIC, N.; KOVAC-BESOVIC, E.; MORNJAKOVIC, Z.; UZUNOVIC, A.; ELEZOVIC, A.; HADZIDEDIC, S. Topical anti-inflammatory activity of ointments with 1% of crude water extracts of rhizoma and herb *Potentilla reptans* L. in croton oil model of mouse ear inflammation. **Planta Medica**, v. 76, n. 12, 2010.

QUAN, T.; FISHER, G. J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: A mini-review. **Gerontology**, v. 61, n. 5, p. 427–434, 2015.

QUAN, T.; SHAO, Y.; HE, T.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 2, p. 415–424, 2010.

RIZZI, V.; GUBITOSA, J.; FINI, P.; COSMA, P. Neurocosmetics in skincare-the fascinating world of skin-brain connection: A review to explore ingredients, commercial products for skin aging, and cosmetic regulation. **Cosmetics**, v. 8, n. 3, 2021.

ROSA, A. C.; FERRARO, A.; SILVA, R. H.; POTT, V. J.; VICTÓRIO, C. P.; ARRUDA, R. C. O. Leaf anatomy of two medicinal *Croton* species: Contribution to plant recognition. **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 8, p. 1685–1695, 2021.

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**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

RYAN, G. B.; CLIFF, W. J.; GABBIANI, G.; IRLE, C.; MONTANDON, D.; STATKOV, P. R.; MAJNO, G. Myofibroblasts in human granulation tissue. **Human Pathology**, v. 5, n. 1, p. 55–67, 1974.

SALAM, A.; DADZIE, O. E.; GALADARI, H. Chemical *peeling* in ethnic skin: An update. **British Journal of Dermatology**, v. 169, n. SUPPL. 3, p. 82–90, 2013.

SALDANHA, A. L. **Saúde do idoso: a arte de cuidar**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007.

SOLEYMANI, S.; IRANPANAH, A.; NAJAFI, F.; BELWAL, T.; RAMOLA, S.; ABBASABADI, Z.; MOMTAZ, S.; FARZAEI, M. H. Implications of grape extract and its nanoformulated bioactive agent resveratrol against skin disorders. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, n. 8, p. 577–588, 2019.

SOLEYMANI, T.; LANOUE, J.; RAHMAN, Z. A practical approach to chemical peels: A review of fundamentals and step-by-step algorithmic protocol for treatment. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 11, n. 8, p. 21–28, 2018.

SUGIHARTINI, N.; SARIDEWI, R.; M, U. R.; RAHMAWANTI, F.; YULIANI, S.; SOPHIA, V. Anti-inflammatory Activity of *Camellia sinensis*, I. Extract Cream Combined with Vitamin C as Antioxidant on Croton Oil-induced Inflammation in Male Mice Strain BALB/C. **Majalah Obat Tradisional**, v. 22, n. 2, p. 73, 2017.

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**, v. 86, n. 5, p. 917–923, 2011.

TAKEI, H.; ARAKI, A.; WATANABE, H.; ICHINOSE, A.; SENDO, F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 2, p. 229–240, 1996.

TRAN, N.; PHAM, B.; LE, L. Bioactive Compounds in Anti-Diabetic Plants: From Herbal Medicine to Modern Drug Discovery. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 252, 28 ago. 2020.

TRUCHUELO, M.; CERDÁ, P.; FERNÁNDEZ, L. F. *Peeling* químico, una herramienta útil en la consulta. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 108, n. 4, p. 315–322, 2016.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA LOGGIA R. The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, v. 17, n. 3–4, p. 347–349, jan. 1986.

UNIFAL. **Histologia inerativa: Pele e anexos**. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/pele-e-anexos> Acesso em: 31 jan. 2022.

USP. **Histologia: 15-14 Pele**. Disponível em: <https://mol.icb.usp.br/index.php/15-14-pele/> Acesso em: 03 fev. 2021.

- VAN DE GRAAFF, K. M. **Anatomia Humana**. Barueri: Manole, 2003.
- VASCONCELOS, B. N.; FIGUEIRA, G. M.; FONSECA, J. C. M.; MENDONÇA, L. M.; FONSECA, C. R. Estudo comparativo de hemifaces entre 2 *peelings* de fenol (fórmulas de BakerGordon e de Hetter), para a correção de rírides faciais. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 5, n. 1, p. 40–44, 2013.
- VEDRENNE, N.; COULOMB, B.; DANIGO, A.; BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. The complex dialogue between (myo) fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing. **Pathologie Biologie**, v. 60, n. 1, p. 20–27, 2012.
- VELASCO, M. V. R.; RIBEIRO, M. E.; BEDIN, V.; OKUBO, F. R.; STEINER, D. Rejuvenescimento da pele por *peeling* químico: Enfoque no *peeling* de fenol. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 1, p. 91–9, 2004.
- VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery (oxford)**, v. 29, n. 10, p. 471–474, 2011.
- VIGNERON, J.-L. H.; MUGGENTHALER, F. *Peeling* mit Phenol. **Journal für Ästhetische Chirurgie**, v. 9, n. 1, p. 9–19, 2016.
- WAMBIER, C. G.; FREITAS, F. P. **Chemical and Physical Peelings**. 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**, v. 81, n. 2, p. 327–336, 2019.
- WANG, H. B.; WANG, X. Y.; LIU, L. P.; QIN, G. W.; KANG, T. G. Tiglane Diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae Families. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 9, p. 2975–3011, 2015.
- WANG, X.; LAN, M.; WU, H. P.; SHI, Y. Q.; LU, J.; DING, J.; WU, K. C.; JIN, J. P. FAN, D. M. Direct effect of croton oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 1, p. 103, 2002.
- WANG, X.; ZHANG, F. M.; LIU, Z. X.; FENG, H. Z.; YU, Z. B.; LU, Y. Y.; ZHAI, H. H.; BAI, F. H.; SHI, Y. Q.; LAN, M.; JIN, J. P.; FAN, D. M. Effects of essential oil from *Croton tiglium* L. on intestinal transit in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 102–107, 2008.
- WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450–462, 2016.
- YANG, H.; BIERMANN, M. H.; BRAUNER, J. M.; LIU, Y.; ZHAO, Y.; HERRMANN, M. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.
- YOKOMIZO, V. M. F.; BENEMOND, T. N. H.; CHISAKI, C.; BENEMOND, P. H. *Peelings* químicos: Revisão e aplicação prática. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 5, n. 1, p. 58–68, 2013.

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

ZELTZ, C.; GULLBERG, D. Correction to The integrin-collagen connection - A glue for tissue repair? **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 6, p. 1284, 2016.

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

**APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO**



**JUSTO, A. S.; LEMES, B. M.; NUNES, B.; ANTUNES, K. A.; CARLETTO, B.; KOGA, A. Y.; Lipinski, L.C.; NETTO, M. R. M.; Campagnoli, E. B.; Beltrame, L. F.; WAMBIER, C. G.** Depth of injury of Hetter's phenol-croton oil chemical peel formula using 2 different emulsifying agents. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 82, n. 6, p. 1544-1546, 2020.

1544 Research Letters

J AM ACAD DERMATOL  
JUNE 2020

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

*IRB approval status:* Not applicable.

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

*E-mail:* carlos\_wambier@brown.edu

#### REFERENCES

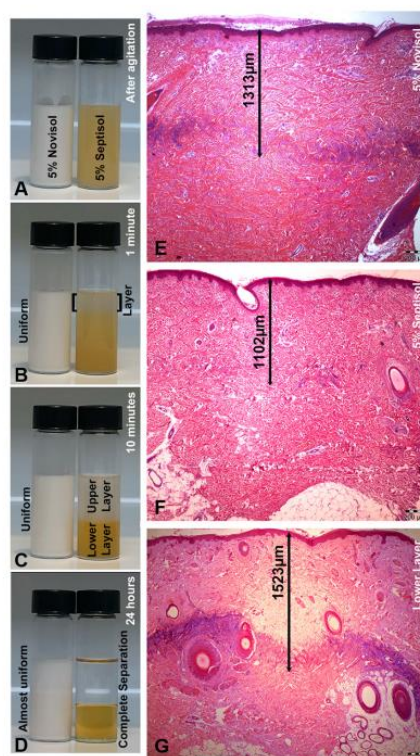
1. American Society for Dermatologic Surgery. ASDS consumer survey on cosmetic procedure. 2018. Available at: <https://www.asds.net/Portals/0/PDF/consumer-survey-2018-infographic.pdf>. Accessed March 14, 2019.
2. Bridenstine JB, Dolezal JF. Standardizing chemical peel solution formulations to avoid mishaps.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

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

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

*To the Editor:* Deep chemical peels consist of the application of a mixture of phenol, croton oil, water, and, historically, a handwash soap containing triclosan and sodium C<sub>14-16</sub> olefin sulfonate as the emulsifying agent (Septisol [SEP], Steris Corp, Mentor, OH).<sup>1</sup> Because of the US Food and Drug Administration's final rule on hand sanitizers,<sup>2</sup> which prohibits the use of triclosan, SEP was discontinued. The classic Baker-Gordon's formula<sup>3</sup> (2.1% croton oil/49.3% phenol) and Hetter's standardized formulas (0.1%-1.6% croton oil/35% phenol) contained 5% SEP, which generated a very unstable emulsion<sup>1</sup> that spontaneously separated into 2 distinct layers (an upper and a lower layer) within minutes (Fig 1, A-D, right). A mild cleanser containing water, PEG-80 sorbitan laurate, benzyl alcohol, ethylhexylglycerin, and ammonium hydroxide, with pH = 11 (Novisol [NOV], Young Pharmaceuticals, Inc, Wethersfield, CT), has been adopted since 2018 by some dermatologists and plastic surgeons in phenol-croton oil peels<sup>4</sup> because of improved emulsion stability (Fig 1, A-D, left).

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



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

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

**JUSTO, A. S.; LEMES, B. M.; NUNES, B.; ANTUNES, K. A.; CAPOTE, A. C. M.; LIPINSKI, L. C.; CAMPAGNOLI, E. B.; EMILIANO, J.; MEURER, E.C.; EZEMMA, O.; MIOT, H. A.; BELTRAME, F. L.; WAMBIER, C. G.** Characterization of the Activity of Croton tiglium Oil in Hetter's Very Heavy Phenol–Croton Oil Chemical Peels. *Dermatologic Surgery*, v. 47, n. 7, p. 944-946, 2021.

## Original Article

# Characterization of the Activity of *Croton tiglium* Oil in Hetter's Very Heavy Phenol–Croton Oil Chemical Peels

Aline S. Justo, PharmD, MSc,\* Bruna M. Lemes, PharmD, MSc,\* Bruna Nunes, PharmD,\* Kevin A. Antunes, PharmD,\* Anna Claudia M. O. Capote, PharmD,\* Leandro C. Lipinski, VetD, PhD,† Eduardo B. Campagnoli, DMD, PhD,‡ Janaina Emiliano, MSc,§ Eduardo C. Meurer, ChemD, PhD,|| Ogechi Ezemma, BA,¶ Helio A. Miot, MD, PhD,\*\* Flávio L. Beltrame, PharmD, PhD,\* and Carlos G. Wambier, MD, PhD¶

**BACKGROUND** Croton oil (CO) is used by dermatologists and plastic surgeons in deep chemical peels. It is mixed with phenol, water, and a soap in Baker–Gordon's or Hetter's formulas. There is controversy as to whether CO or phenol is the active agent in the dermal effect of deep chemical peels.

**OBJECTIVE** To better clarify the role of CO in deep peels, by identification of active compounds in commercially available CO in the United States and biological effects in vivo.

**MATERIALS AND METHODS** Liquid chromatography–tandem mass spectrometry on CO and a domestic pig model experiment using 3 different formulas: G1: 5% Septisol (SEP), G2: 1.6% croton oil in 35% phenol with 5% SEP, and G3: 35% phenol with 5% SEP.

**RESULTS** Liquid chromatography–tandem mass spectrometry indicated the presence of phorbol esters. G1 was null overall. Extent of the coagulative necrosis: G2 > G3. Vascular ectasia: G2 > G3. Inflammation pattern: intense neutrophilic inflammatory band in G2 versus mild, sparse, perivascular mononuclear cell infiltrate in G3. Neocollagenesis: pronounced in G2, negligible in G3.

**CONCLUSION** Coagulative necrosis of the epidermis, superficial fibroblasts, and vasculature can be attributed to the action of phenol. Phorbol esters on CO could be responsible for the dense deep acute inflammation and the distinctive neocollagenesis.

**C**roton tiglium oil (CO) is a common component used by dermatologists and plastic surgeons in deep chemical peels since the 1950s. It is obtained from the seeds of *Croton tiglium*, which contains secondary metabolites (diterpenes), which include important biologically active compounds, the phorbol esters. CO is mixed with other ingredients including phenol, water, and an emulsifying agent in Baker–Gordon's and Hetter's peels.<sup>1–3</sup>

The specific roles of CO and phenol remain controversial. Phenol was believed to be the main agent of the formula, and croton oil was believed to be a minor irritant, until Hetter<sup>2</sup> introduced the CO strength grading method. The results showed that phenol without CO caused a mild

skin reaction without remarkable peeling.<sup>2</sup> The addition of CO caused an increase in the depth of injury in the dermis, which may be related to some proinflammatory compounds present in this vegetal matrix.<sup>2,4</sup> The objective of this study was to better clarify the role of CO in deep chemical peels and identify the presence of these proinflammatory compounds.

## Methods

A chemical study using liquid chromatography–tandem mass spectrometry was performed on CO (from Delasco, Council Bluffs, IA) and an in vivo domestic pig model experiment (2 males and 2 females, 4–5 months old, 30–35 kg) testing: Group 1 (G1): 5% Septisol ([SEP], Steris Corp, Mentor, OH) in water; Group 2 (G2): Hetter's very heavy formula,<sup>3</sup> (1.6% CO/35% phenol/5% SEP); and Group 3 (G3): 35% phenol/5% SEP. Each formula was applied on 9 spots of 4 cm<sup>2</sup>/pig using a saturated wooden swab applicator with increasing pressure (30 circular strokes). The endpoint was a solid white frost followed by a fine gray cast. Because G2 and G3 are unable to form stable emulsions because of SEP,<sup>5</sup> they were carefully shaken (capped glass vial) within seconds before its application.

Histopathological evaluation was performed on post-operative days 1, 7, and 21. Primary outcomes were defined as differences in the inflammation pattern: intensity, cellularity, distribution, and depth (day 1). Secondary outcomes were defined as thickness of the eschars (day 7),

From the Departments of \*Pharmaceutical Sciences, †Medicine, ‡Dentistry, and §Laboratory of Research of SEBISA, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Puerto Rico, Brazil; †Laboratory Fenn of Massachusetts Spectrometry, Federal University of Paraná, Jandaia do Sul, Puerto Rico, Brazil; ‡Department of Dermatology, The Warren Alpert Medical School of Brown University, Rhode Island; \*\*Department of Dermatology and Radiotherapy, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

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

The authors have indicated no significant interest with commercial supporters.

Address correspondence and reprint requests to: Carlos G. Wambier, MD, PhD, Department of Dermatology, Rhode Island Hospital, 583 Eddy Street, APC Building, 10th Floor, Providence, RI 02903; or e-mail: carlos\_wambier@brown.edu  
http://dx.doi.org/10.1097/DSS.0000000000002990



PAIVA, M. L.; MIOT, H. A.; BELTRAME, F. L.; JUSTO, A. S.; HARRINGTON, D. T.; HUNTER, M. A.; WAMBIER, C. G. 815 Translational Research in Skin of Color Spontaneous Repigmentation of Post-Chemical Burn Leucoderma. *Journal of Burn Care & Research*, v. 43, n. Supplement\_1, p. S213-S214, 2022.

814 **Devices measuring transepidermal water loss of the skin: a systematic review of measurement properties**

Tanja Klotz, BSc, BAppSc(OT), MClInSc, PhD Candidate, Abdullah Ibrahim, MBBS (HONS I), MS (SURGICAL SKILLS), Guy Maddern, PhD MS MS FRACS, Yugesh Caplash, MBBS, MS, MCh, FRACS, Marcus Wagstaff, BSc, MBBS, PhD, FRCS(Plast), FRACS

*Royal Adelaide Hospital, Panorama, Adelaide, South Australia; Royal Adelaide Hospital, Adelaide, South Australia; University of Adelaide, Woodville, South Australia; Royal Adelaide Hospital, Adelaide, South Australia; Royal Adelaide Hospital, Adelaide, South Australia*

**Introduction:** TEWL is a physiological property of skin which increases when the epidermis is damaged. It is, therefore, a commonly utilised measure of skin barrier integrity. Devices measuring TEWL are available as open, semi-open or closed chamber. Studies of reliability examine the consistency of measurement, and/or responsive whereas measurement error scores in absolute terms the amount of error due to sources of variation.

**Methods:** The search strategy aimed to locate published and unpublished studies. Databases searched included PubMed, Embase, CINAHL and Web of Science, utilising identified keywords and limited to studies in English. Grey literature sources were searched to identify any unpublished documents. Study selection using the inclusion criteria was then assessed by two reviewers for methodological quality utilising the COSMIN risk of bias tool to assess the reliability and measurement error of outcome measurement instruments.

Studies examining the reliability and/or measurement error of TEWL measurement devices were included. Studies that only report on measurement of TEWL outcomes without examination of reliability and/or measurement error were excluded.

**Results:** A total of 22 devices were examined in the 38 included studies. The quality of study design was on average rated as 'Adequate' however reliability and measurement error statistical methods were on average rated as 'Doubtful'.

**Conclusions:** TEWL measurement devices were found to demonstrate good reliability and often correlated with other devices. However, measurement error was highly variable but improves under *in-vitro* conditions.

815 **Translational Research in Skin of Color Spontaneous Repigmentation of Post-Chemical Burn Leucoderma**

Marcelo L. Paiva, MPP; Helio A. Miot, MD, PhD, Flavio L. Beltrame, PharmD, PhD, Aline S. Justo, PharmD, MSc, David T. Harrington, MD, Mary A. Hunter, MD, Carlos G. Wambier, MD, PhD

*The Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island; Department of Dermatology and Radiotherapy, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil, Botucatu, Sao Paulo; Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil, Ponta Grossa, Parana; Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil, Ponta Grossa, Parana; Brown Surgical Associates, Providence, Rhode Island; Department of Surgery, The Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island; Department of Dermatology, The Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island*

**Introduction:** After facial burn injuries to skin of color (SOC) patients, repigmentation plays a critical role in post-burn quality of life, given the acquired contrast between preserved skin and achromic scars, and that daily concealment may be difficult. While leucoderma is a well-known side-effect of deep chemabrasion with phenol, phenol-croton oil, and high concentration trichloroacetic acid, mechanisms of repigmentation are still not fully understood, and the observation of spontaneous repigmentation of a deep chemical injury in SOC has not previously been described in the literature. In our study, we present the dynamics of long-term spontaneous facial repigmentation of a Fitzpatrick V chemical burn patient, with microscopic findings of a deep chemical peel SOC animal model.

**Methods:** We demonstrate spontaneous repigmentation in a 37-year-old female who initially presented with depigmented areas, erosions and eschars on the face, 7 days after accidental deep chemical burn, due to self-application of 70% glycolic acid to improve acne. This is juxtaposed with a SOC porcine experiment, performed with 35% phenol, 1.6% croton-oil, to evaluate depth-of-injury, neocollagenesis band thickness in 21 days, and skin pigmentary safety. A 6mm punch biopsy taken at 21 days underwent Herovici staining to reveal the thickness of collagen type III neocollagenesis, confirm the presence of melanin in the epidermis, and evaluate the presence of melanophages.

**Results:** On patient presentation, epidermolysis and areas of deep dermal burns were observed over the forehead and cheeks. At 14 days, multiple leucoderma scars persisted and initial perifollicular repigmentation was noticeable. At 28 days, most of the skin was repigmented; however, many areas had only perifollicular repigmentation and still very severe leucoderma. At 6 months, the skin still had small areas of leucoderma with follicular repigmentation. At 11 months the skin color was fully recovered, with minimal post-inflammatory hyperpigmentation (PIH) over the cheeks.

As for the SOC animal model, at 7 days the eschar was detached, and the skin was achromic. At 21 days, skin pigmentation was completely restored without macroscopic signs of PIH. Dermatopathology evaluation revealed microscopic

LEMES, B. M.; JUSTO, A. S.; LIN, E. M.; CAPOTE, A. C. M.; NEVES, A. K. L.; MACHINSKI, I.; PEREIRA, A.V.; KOGA, A. Y.; LIPINSKI, L. C.; BELTRAME, F. L.; MIOT, H. A.; WAMBIER, C. G. The effects of 35% Trichloroacetic acid-Croton oil and 35% Glycolic acid-Croton oil compared to 35% Phenol-Croton oil Hetter's very heavy formula for deep chemical peel. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 87, n. 5, p. 1227-1229, 2022.

## The effects of 35% trichloroacetic acid-Croton oil and 35% glycolic acid-Croton oil compared to 35% phenol-Croton oil Hetter's very heavy formula for deep chemical peel



Bruna Mikulis Lemes, PharmD, PhD,<sup>a</sup> Aline da Silva Justo, PharmD, MSc,<sup>a</sup> Erica Miyake Lin, BS,<sup>b</sup> Anna Claudia M. O. Capote, PharmD,<sup>a</sup> Anny K. L. Neves, PharmD,<sup>a</sup> Isadora Machinski, PharmD,<sup>a</sup> Airon V. Pereira, PharmD, PhD,<sup>a</sup> Adriana Yuriiko Koga, PharmD, PhD,<sup>c</sup> Leandro C. Lipinski, VetD, PhD,<sup>c</sup> Flavio Luis Beltrame, PharmD, PhD,<sup>d</sup> Helio A. Miot, MD, PhD,<sup>e</sup> and Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD<sup>b</sup>

**Key words:** chemabrasion; chemexfoliation; chemical peels; collagen; Croton oil; emulsions; glycolic acid; Hetter's formula; neocollagenesis; phenol; phorbol esters; trichloroacetic acid.

**T**o the Editor: Phenol-Croton oil peels are a well-established method for deep chemical skin rejuvenation.<sup>1</sup> Phenol induces epidermal and upper dermis coagulative necrosis (medium-depth peel), and when mixed with Croton tiglium oil (CO), the necrosis reaches the reticular dermis. This induces intense neocollagenesis, which is enhanced by the proinflammatory effects of phorbol esters (PE) from CO.<sup>2,3</sup> Phenol may be underutilized due to awareness of hypopigmentation and cardiac arrhythmia risks.<sup>1-4</sup> Here, we investigated the potential of inducing deep peeling with CO mixed with noncardiotoxic chemicals: glycolic acid (GA) or trichloroacetic acid (TCA).

Formulas containing 1.6% CO in 35% phenol, 35% GA, or 35% TCA as active ingredients (Delascon) were mixed with 5% surfactant (Septisol, Steris) and water (inactive ingredients, negative control). Immediately after vigorous agitation of the dispersions, pH was measured and application was performed on 4 domestic pigs (2 male/2 female) aged 5 months

weighing 30 to 35 kg; after hairclipping and acetone degreasing, in 9 areas measuring 4 cm<sup>2</sup> using a saturated cotton swab with increasing pressure (30 circular strokes). Three areas were biopsied from each pig (D1, D7, and D21) for histopathological evaluation with hematoxylin and eosin staining. The D21 samples underwent picrosirius red staining to assess neocollagenesis depth and density.

The TCA formula had the highest acidity (pH 1.97), followed by GA (pH 2.55) and phenol (pH 5.2). Phenol and TCA caused a solid white frosting, which was not observed for GA. The main histopathologic findings at D1, D7, and D21 are summarized in Table 1. A greater depth and proportion of type III collagen was induced by phenol compared with GA and TCA. Additionally, GA promoted a superior depth of neocollagenesis compared with TCA (Fig 1).

Although the GA and TCA formulas were more acidic than the phenol formula, both promoted only superficial neocollagenesis, which was limited to the

From the Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil<sup>a</sup>; Department of Dermatology, The Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island<sup>b</sup>; Department of Medicine, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil<sup>c</sup>; and Department of Dermatology, Unesp Medical School, Botucatu, São Paulo, Brazil.<sup>d</sup>

Funding sources: None.

IRB approval status: Reviewed and approved by the State University of Ponta Grossa IRB and Ethics Committee on the Use of Animals; approval #094/2017/CEUA/UEPG.

Correspondence and reprint requests to: Carlos Gustavo Wambier, MD, PhD, Department of Dermatology, Rhode Island Hospital, 593 Eddy St, APC building, 10th floor, Providence, RI 02903. E-mail: carlos\_wambier@brown.edu; Twitter: @WambierMD.

J Am Acad Dermatol 2022;87:1227-9.

0190-9622/536.00

© 2022 by the American Academy of Dermatology, Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2022.07.023>