Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Química

Interação da pele humana com fenol: determinação do mecanismo e caracterização do efeito de *peeling*

SABRINA MACIEL DO NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Younés Messaddeq
Co-orientadora: Profª Drª Hérida Regina Nunes Salgado

Araraquara
2007

DEDICATÓRIA

Quero, mais do que tudo, dedicar este trabalho aos meus pais, Roberto e Martha, por tudo o que fizeram por mim, muitas vezes se sacrificando para me dar o melhor, com toda a dedicação e amor do mundo. Às minhas irmãs, Tarsila e Alessandra, que sempre foram muito mais do que irmãs, foram minhas melhores amigas e incentivadoras. Ao meu namorado, Alisson e à minha "segunda família", minha sogra, Liliana e meus cunhados e sobrinhos, por terem dividido comigo, durante todo este tempo, tantos momentos de alegria, de angústia, de ansiedade...

À toda minha família e amigos que sempre estiveram ao meu lado, comemorando comigo e me dando forças para superar os obstáculos e as dificuldades, acreditando sempre em mim.

Muito obrigada,

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus por ter sempre iluminado meus caminhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Younés Messaddeq, pela confiança e ensinamentos.

Um agradecimento especial à minha co-orientadora, Profª Hérida R. N. Salgado, por ser além de mentora, amiga, por todo seu carinho e atenção.

Ao Dr. Lecy Marcondes Cabral, pela parceria e confiança e por todos os ensinamentos.

Ao grupo de Materiais Fotônicos, Instituto de Química – UNESP, por ter me recebido tão bem e me apoiado durante todo o meu trajeto.

Um agradecimento muito especial à Profª Drª Dalva Lúcia de Araújo Faria, por todo seu carinho, atenção, dedicação e ensinamentos.

A todos do Departamento de Orgânica, que direta ou indiretamente, me ajudaram muito, Dr. Juliano Cardoso e Dr. Alberto Camilo Alécio e especialmente ao Dr. Cláudio Viegas Jr., pelo carinho, conversas e apoio sempre!

A todos os meus amigos pelos indispensáveis momentos de alegria que me dão sempre, e pelo apoio nos momentos de dificuldades.

A todos que me ajudaram durante este trajeto, ao pessoal da Odontologia e da Farmácia da UNESP e do LIEC – UFSCar, que contribuíram muito e foram indispénsáveis à realização do meu trabalho, à Profª Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho, ao Prof. Iguatemy Lourenço Brunetti, à Profª Regina Célia Vendramini e ao Prof. Edson Roberto Leite, e em especial ao Pedrinho e ao Giovanni.

Ao Instituto de Física da UFPE, em especial ao Prof. Anderson Stevens Leônidas Gomes, pelo apoio e amizade e ao Bernardo.

À Secretaria de Pós-graduação por todo o apoio necessário.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada a todos!

“:.Cantar (e cantar e cantar) a beleza de ser um eterno aprendiz...”

(Gonzaguinha)

RESUMO

O *peeling* químico consiste na aplicação de um ou mais agentes esfoliantes para obter, primeiramente, destruição e posterior regeneração de parte da epiderme e derme. O *peeling* de fenol é o método mais profundo de *peeling* químico, onde o agente penetra na epiderme, causando sua necrose e induzindo reação inflamatória controlada não só na epiderme como também na derme, estimulando a síntese de colágeno, determinante no processo de rejuvenescimento facial. O presente trabalho envolveu diversas etapas. A primeira foi a determinação da composição da formulação comercialmente utilizada, análise realizada com o auxílio das técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (C^{13}-RMN), chegando à composição de fenol a 50% e ácido salicílico a 13% em etanol. Foram realizados ensaios biológicos preliminares com camundongos (*Mus musculus*) para aprendizado do manuseio e observação dos efeitos macroscópicos do *peeling*. Foram realizados ensaios com coelhos (*Oryctolagus cunniculus)*, onde foram selecionados alguns marcadores de toxicidade para a determinação de toxicidade aguda cardíaca, hepática e renal. Para todos os grupos experimentais os testes forneceram resultados negativos, mostrando a ausência de toxicidade. Ensaios de mimetização *in vitro* da reação ocorrente na pele, com o acompanhamento por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), não forneceram resultados satisfatórios. Para a caracterização da pele e o entendimento do mecanismo de ação do *peeling*, foram realizados ensaios com camundongos (*Mus musculus)*, onde foram utilizadas as técnicas de Histologia, Espectrometria Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman) e Tomografia por Coerência Óptica (OCT).

Palavras-chave: pele, *peeling* químico, fenol, rejuvenescimento facial.

ABSTRACT

Chemical peeling consists of the application on the skin of one or more exfoliating agents to obtain first destruction and then regeneration of part of the epidermis and dermis. The phenol peel is the deepest peeling method, where the agent of the peeling penetrates in the epidermis, causing a controlled wound and determining the cutaneus renewal after the synthesis of new collagen fibers. The present work involved various stages. The first was the determination of the composition of the trade sample, using Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Nuclear Magnetic Ressonance of the Nucleus C^{13} (^{13}C-NMR), concluding that it is composed by 50% phenol, 13% salicylic acid in ethanol. Preliminary biological assays were performed with mice (*Mus musculus*) with the aim of learning the techniques of handling and the observation of the macro effects of the peeling. Rabbits (*Oryctolagus cunniculus)* were used to other assays, where some toxicity markers were selected and analysed to determine acute heart, liver and kidney toxicity. For all the experimental groups the results were negative. For the skin characterization and the comprehension of the action mechanism of the peeling, assays were performed with mice (*Mus musculus*), where it was taken into account the analysis of Histology, Fourier Transform Infrared Spectrometry (FT-Raman) and Optical Coherence Tomography (OCT).

Key words: skin, chemical *peeling*, phenol, face renewal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema explicativo da constituição da pele..... 24

Figura 2 - Etapas de envelhecimento da pele. Análise através de imagem tridimensional..... 25

Figura 3 – Fotografias de paciente de 72 anos de idade em diferentes fases do tratamento..... 28

Figura 4 – Micrografias dos cortes histológicos de pele humana..... 29

Figura 5 – Estrutura das fosfoguanidinas..... 38

Figura 6 – Procedimento de depilação de região dorsal dos coelhos a serem utilizados nos ensaios de toxicidade..... 47

Figura 7 – Imobilização dos coelhos, em caixa de madeira própria para este procedimento, para a coleta de sangue..... 48

Figura 8 – Coleta de sangue dos coelhos para ensaios de toxicidade..... 49

Figura 9 – Procedimento de depilação da região dorsal de camundongos a serem utilizados nos ensaios de FT-Raman, Histologia e OCT..... 53

Figura 10 – Extração do fragmento de pele da região dorsal dos camundongos, analisados por FT-Raman, Histologia e OCT..... 53

Figura 11 – Espectrômetro Raman Bruker RFS100/S..... 54

Figura 12 – Equipamento inclusor dos fragmentos de pele em parafina..... 55

Figura 13 – Micrótomo (bloco contendo amostra preparado para ser cortado)..... 56

Figura 14 – Deposição dos cortes histológicos sobre a lâmina..... 56

Figura 15 – Montagem esquemática de equipamento utilizado para realização das análises de OCT..... 59

Figura 16 – Cromatograma de CG-MS da amostra comercial (Multipeel®)..... 60

Figura 17 – Espectro de massas referente ao primeiro pico do cromatograma da amostra comercial..... 60

Figura 18 – Espectro de massas referente ao segundo pico do cromatograma da amostra comercial..... 62

Figura 19 – Espectro RMN da amostra comercial. Confirmação da composição da amostra..... 64

Figura 20 – Identificação dos carbonos nas moléculas de fenol e AS para atribuição dos sinais de C^{13}-RMN..... 65

Figura 21 – Curva analítica para quantificação do fenol na amostra comercial..... 66

Figura 22 – Cromatografia de HPLC-UV da amostra comercial $\lambda = 254$ nm..... 67

Figura 23 – Cromatografia de HPLC-UV da amostra comercial $\lambda = 320$ nm..... 67

Figura 24 - Curva analítica para a identificação do AS na amostra comercial..... 68

Figura 25 – Fotografia do dorso do animal pertencente ao grupo controle (sem aplicação).... 70

Figura 26 – Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes aos 4 grupos experimentais no 3^o dia após as aplicações..... 70

Figura 27 – Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes aos 4 grupos experimentais no 7^o dia após as aplicações..... 71

Figura 28 – Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes ao grupo controle (sem aplicação, animais apenas com o dorso depilado)..... 73

Figura 29 – Fotos dos dorsos dos animais pertencentes ao grupo 1 (AC – amostra comercial), acompanhamento do procedimento..... 73

Figura 30 - Fotos dos dorsos dos animais pertencentes ao grupo 2 (FE - fenol), acompanhamento do procedimento..... 75

Figura 31 – Fotos dos dorsos dos animais pertencentes ao grupo 3 (AS – ácido salicílico), acompanhamento do procedimento..... 76

Figura 32 – Fotos dos dorsos dos animais pertencentes ao grupo 4 (NF – nova formulação), acompanhamento do procedimento..... 77

Figura 33 – Histograma representativo da variação da atividade enzimática de AST em soro de coelhos. Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais..... 78

Figura 34 – Histograma representativo da variação da atividade enzimática de ALT em soro de coelhos.Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais..... 80

Figura 35 – Histograma representativo da variação da atividade enzimática de CK em soro de coelhos.Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais..... 82

Figura 36 – Histograma representativo da variação da concentração de uréia em soro de coelhos.Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais..... 84

Figura 37 – Histograma representativo da variação da concentração de creatinina em soro de coelhos.Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais..... 85

Figura 38 – Espectros FT-Raman (2000 a 500 cm^{-1}) dos fragmentos de pele dorsal dos animais pertencentes ao grupo 1 (AC-amostra comercial)..... 88

Figura 39 – Espectros FT-Raman (2000 a 500 cm^{-1}) dos fragmentos de pele dorsal dos animais pertencentes ao grupo 2 (FE-fenol)..... 89

Figura 40 – Espectros FT-Raman (2000 a 500 cm^{-1}) dos fragmentos de pele dorsal dos animais pertencentes ao grupo 3 (AS-ácido salicílico)..... 89

Figura 41 – Espectros FT-Raman (2000 a 500 cm^{-1}) dos fragmentos de pele dorsal dos animais pertencentes ao grupo 4 (NF-nova formulação)..... 90

Figura 42 – Gráfico da variação da razão $A_{(1657)}/A_{(1445)}$ em função do tempo..... 91

Figura 43 – Corte histológico do grupo controle, coloração HE, epitélio e conjuntivo da derme normais..... 100

Figura 44 – Corte histológico do grupo controle, coloração HE, colágeno maduro da derme..... 100

Figura 45 – Corte histológico do grupo controle, coloração TM, epitélio e conjuntivo da derme normais..... 101

Figura 46 – Corte histológico do grupo controle, coloração HE, a derme com densos feixes colágenos..... 101

Figura 47 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 3º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral..... 102

Figura 48 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 3º dia após a aplicação, coloração HE, ausência de papilas conjuntivas..... 102

Figura 49 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 3º dia após a aplicação, coloração HE, sinais de inflamação leve 103

Figura 50 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 3º dia após a aplicação, coloração TM, ausência de figuras de mitose e rompimento do tecido epitelial..... 103

Figura 51 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral..... 104

Figura 52 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração HE, ausência de papilas conjuntivas..... 104

Figura 53 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral..... 105

Figura 54 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração TM, epiderme e camada granulosa 105

Figura 55 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 12º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral..... 106

Figura 56 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 12º dia após a aplicação, coloração HE, infiltrado inflamatório e vasos linfáticos..... 106

Figura 57 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 12º dia após a aplicação, coloração HE, exposição do tecido conjuntivo dermal..... 107

Figura 58 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 12º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral..... 107

Figura 59 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração TM, acumulado de leucócitos..... 108

Figura 60 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 3º dia após a aplicação, coloração HE, exposição do conjuntivo com crosta de material necrótico..... 108

Figura 61 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 3º dia após a aplicação, coloração HE, conjuntivo dermal com inflamação..... 109

Figura 62 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 3º dia após a aplicação, coloração TM, crosta de material necrótico recobrindo o conjuntivo..... 109

Figura 63 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 3º dia após a aplicação, coloração HE, vasos sangüíneos comprometidos..... 110

Figura 64 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral..... 110

Figura 65 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração HE, completa desorganização epitelial..... 111

Figura 66 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração HE, infiltrado inflamatório profundo..... 111

Figura 67 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral..... 112

Figura 68 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração TM, desorganização dermal..... 112

Figura 69 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 12º dia após a aplicação, coloração HE, epitélio sem papilas conjuntivas..... 113

Figura 70 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 12º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio fino sem papilas conjuntivas..... 113

Figura 71 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral..... 114

Figura 72 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração HE, epitélio normal, sem papilas conjuntivas..... 114

Figura 73 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração HE, tecido conjuntivo normal..... 115

Figura 74 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral..... 115

Figura 75 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio sem papilas conjuntivas..... 116

Figura 76 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração TM, derme com vasos hiperemiados..... 116

Figura 77 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 6º dia após a aplicação, coloração HE, epitélio fino com queratina..... 117

Figura 78 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 6º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio normal, fino, sem papilas conjuntivas. 117

Figura 79 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 12º dia após a aplicação, coloração HE, epitélio fino com queratina..... 118

Figura 80 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 12º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio fino com queratina..... 118

Figura 81 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 12º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio fino, fibras colágenas em feixes..... 119

Figura 82 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 3º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral..... 119

Figura 83 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 3º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral..... 120

Figura 84 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 3º dia após a aplicação, coloração HE, derme com fibroblastos e macrófagos..... 120

Figura 85 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 3º dia após a aplicação, coloração TM, interface derme/epiderme..... 121

Figura 86 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 6º dia após a aplicação, coloração HE, papilas dérmicas e epitélio com queratina..... 121

Figura 87 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 6º dia após a aplicação, coloração HE, macrófagos ativos na derme..... 122

Figura 88 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 6º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio com queratina e papilas conjuntivas..... 122

Figura 89 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 6º dia após a aplicação, coloração TM, feixes de colágenos e macrófagos ativos na derme. 123

Figura 90 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 12º dia após a aplicação, coloração HE, papilas dérmicas e epitélio com queratina..... 123

Figura 91 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 12º dia após a aplicação, coloração HE, derme com macrófagos ativos..... 124

Figura 92 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 12º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral..... 124

Figura 93 – Corte histológico do grupo 4 (proposta de nova formulação), 12º dia após a aplicação, coloração TM, colágeno maduro e imaturo..... 125

Figura 94 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo controle..... 126

Figura 95 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo 1 (amostra comercial), a) 3º dia, b) 6º dia e, c) 12º dia após a aplicação..... 127

Figura 96 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo 2 (fenol), a) 3º dia, b) 6º dia e, c) 12º dia após a aplicação..... 128

Figura 97 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo 3 (ácido salicílico), a) 3º dia, b) 6º dia e, c) 12º dia após a aplicação..... 129

Figura 98 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo 4 (proposta de nova formulação), a) 3º dia, b) 6º dia e, c) 12º dia após a aplicação..... 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da pele de acordo com o envelhecimento. Parâmetro para realização de diferentes tipos de *peeling*..... 31

Tabela 2 – Sistema de classificação de Fitzpatrick..... 31

Tabela 3 – Classificação de enzimas segundo a classificação da IUB e a atividade que catalisam.... 33

Tabela 4 – Algumas enzimas de interesse diagnóstico, sua função, distribuição no organismo e fatores que alteram sua concentração..... 40

Tabela 5 - Quantidade de amostras para a determinação da atividade (enzimas) ou da concentração (metabólitos) dos marcadores de toxicidade..... 48

Tabela 6 – Divisão dos animais entre os grupos experimentais para as análises de FT-Raman, OCT e Histologia..... 52

Tabela 7 – Metodologia para a coloração das lâminas por Hematoxilina/Eosina (HE)..... 57

Tabela 8 - Metodologia para a coloração das lâminas por Tricrômio de Masson (TM)..... 58

Tabela 9 – Atribuições dos sinais do espectro de C^{13}-RMN aos carbonos identificados dos componentes, conforme figura 21..... 64

Tabela 10 – Dados obtidos para a quantificação do fenol por CG-FID..... 65

Tabela 11 – Dados obtidos para a quantificação do AS por HPLC-UV..... 68

Tabela 12 – Atividades enzimáticas da Aspartato aminotransferase em soro sangüíneo de coelhos. 78

Tabela 13 – Atividades enzimáticas da Alanina aminotransferase em soro sangüíneo de coelhos.... 80

Tabela 14 – Atividades enzimáticas da creatina quinase em soro sangüíneo de coelhos..... 82

Tabela 15 – Concentração de uréia em soro sangüíneo de coelhos..... 83

Tabela 16 – Concentração de creatinina em soro sangüíneo de coelhos..... 85

Tabela 17 – Razão uréia/creatinina para os grupos experimentais em todos os períodos de análise.. 87

Tabela 18 – Freqüências de absorção (cm^{-1}) no FT-Raman e atribuição dos modos vibracionais para pele (*stratum corneum*)..... 90

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Reação catalisada pela AST. 35

Esquema 2 - Reação catalisada pela ALT. 36

Esquema 3 - Reação catalisada pela CK. 38

Esquema 4 - Produção de uréia no fígado. 41

Esquema 5 - Degradação da creatina à creatinina. 42

Esquema 6 - Princípio do método de determinação de AST. 50

Esquema 7 - Princípio do método de determinação de ALT. 50

Esquema 8 - Princípio do método de determinação de CK. 50

Esquema 9 - Princípio do método de determinação de uréia. 51

Esquema 10 - Princípio do método de determinação de creatinina. 51

Esquema 11 – Ionização da molécula de fenol. Obtenção do íon molecular (m/z = 94). 61

Esquema 12 – Fragmentação do íon molecular de fenol. Rearranjo intramolecular gerando o íon m/z = 66. 61

Esquema 13 – Ionização da molécula de AS. Obtenção do íon molecular (m/z = 138). 62

Esquema 14 – Fragmentação do íon molecular de AS. Eliminação de H_2O pelo efeito orto e geração do íon m/z = 120 62

Esquema 15 – Geração do íon m/z = 92 por perda de –CO a partir de um fragmento instável. 63

Esquema 16 – Abertura do anel. Geração do íon m/z = 64. 63

Esquema 17 - Mecanismo proposto para o rompimento da ponte dissulfeto. Reação entre fenol e a proteína queratina. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Amostra Comercial - Grupo experimental 1
ADP	Adenosina Difosfato
ALT	Alanina Aminotransferase
AS	Ácido Salicílico – Grupo experimental 3
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CG-FID	Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CK	Creatina Quinase
CON	Controle – Grupo experimental controle
^{13}C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C
D_2O	Água deuterada
FE	Fenol – Grupo experimental 2
FT-Raman	Espectrometria Raman por Transformada de Fourier
G6-PDH	Glicose-6-fosfato
HE	Hematoxilina/Eosina
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
LDH	Lactato Desidrogenase
LIEC	Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica
MDH	Malato Desidrogenase
NAC	Núcleo de Apoio à Comunidade
NADH	Nicotinamida Dinucleotídeo
NF	Nova Formulação – Grupo experimental 4

OCT	Tomografia por Coerência Óptica
p-5'-P	Piridoxal-5'-Fosfato
TCA	Ácido Tricloroacético
TGO	Transaminase Glutâmico Oxaloacética (=AST)
TGP	Transaminase Glutâmico Piruvato (=ALT)
TM	Tricrômio de Masson
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	RMN: deslocamento químico
δ	FT-Raman: deformação angular
ν	estiramento
ρ	rotação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 22

1.1. Pele 22

1.2. Técnicas de *peeling* 26

1.2.1 Histórico 26

1.2.2. *Peeling* de fenol 27

1.2.2.1. Indicações 30

1.3. Toxicidade 32

1.3.1. Transaminases: AST e ALT 33

1.3.1.1. Aspartato aminotrasferase (AST) 35

1.3.1.2. Alanina aminotransferase (ALT) 36

1.3.2. Creatina quinase (CK) 37

1.3.3. Uréia 40

1.3.4. Creatinina 41

2. OBJETIVOS 43

3. MATERIAL E MÉTODOS 44

3.1. Identificação e quantificação dos componentes da amostra comercial 44

3.2. Ensaios biológicos 45

3.2.1. Ensaios preliminares com camundongos 45

3.2.2. Ensaios toxicológicos 46

3.2.2.1. Aspartato Aminotransferase (AST) 49

3.2.2.2. Alanina Aminotransferase (ALT) 50

3.2.2.3. Creatina Quinase (CK) 50

3.2.2.4. Uréia 51

3.2.2.5. Creatinina 51

3.2.3. Espectrometria Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman) 52

3.2.4. Ensaios histológicos 52

3.2.5. Tomografia por Coerência Óptica (OCT) 58

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 60

4.1. Identificação dos componentes da amostra comercial 60

4.2. Quantificação dos componentes da amostra comercial 65

4.3. Proposição do mecanismo de ação...... 68

4.4. Ensaios biológicos 69

4.4.1. Ensaios preliminares com camundongos 69

4.4.2. Ensaios toxicológicos 72

4.4.2.1. Aspartato aminotransferase (AST) 78

4.4.2.2. Alanina aminotransferase (ALT) 80

4.4.2.3. Creatina quinase (CK) 81

4.4.2.4. Uréia 83

4.4.2.5. Creatinina 85

4.4.3. Espectrometria Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman) 87

4.4.4. Ensaios histológicos 92

4.4.4.1.Controle..... 92

4.4.4.2. Amostra comercial 93

4.4.4.3. Fenol 95

4.4.4.4. Ácido salicílico 96

4.4.4.5. Proposta de nova formulação C 98

4.4.5. Tomografia por Coerência Óptica (OCT) 126

4.4.5.1.Controle..... 126

4.4.5.2. Amostra comercial 126

4.4.5.3. Fenol 127

4.4.5.4. Ácido salicílico 128

4.4.5.5. Proposta de nova formulação C 129

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 131

6. REFERÊNCIAS 135

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele

A pele, tecido macio, liso, resistente, flexível e impermeável, é o maior órgão do corpo humano com aproximadamente $2m^2$ de área.

Este envelope vivo, que se renova constantemente, possui diversas funções como: proteção contra raios UV A e B, microrganismos e choques. Seus dois milhões de poros contribuem para a regulação da temperatura corpórea controlando a retenção ou eliminação de água.

Existem, na pele, inúmeros receptores sensoriais e múltiplas inervações, estruturas responsáveis pela recepção e transmissão de informações sensoriais ao cérebro. Neste tecido ocorrem ainda reações de síntese de vitaminas, como a vitamina D, essencial para a fixação de cálcio nos ossos. Além disso, este órgão é ainda um fotoprotetor eficaz e possui surpreendente capacidade de auto-reparação .

Sua constituição é, basicamente, de três camadas. A mais profunda, chamada hipoderme, localizada na região subcutânea, é um tecido gorduroso lobular constituído de adipócitos (células gordurosas). É um colchão protetor, isolante térmico e reservatório energético (lipídeos, ácidos graxos) (Disponível em *Derme et Epiderme,* em <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/menuFLASH.html> Acesso em 05/02/2006)..

Logo acima da hipoderme está a derme, camada de sustentação da pele fortemente aderida à epiderme pela membrana basal (camada de colágeno especializado). A derme é um tecido conjuntivo que assegura as funções de coesão e nutrição da pele. Contém o tecido fibrilar protéico, o bulbo dos pêlos, as glândulas sudoríparas e sebáceas. Estas últimas são responsáveis pela secreção do sebo, uma substância gordurosa e ácida, indispensável à lubrificação da pele e sua proteção contra inúmeros microrganismos. A derme é, ainda, uma

importante malha de terminações nervosas e rica vascularização linfática e sangüínea. É nesta região que se localiza a rede fibrosa macromolecular da pele, tecido constituído de colágenos, elastinas, glicoproteínas e proteoglicanas.

A camada mais externa, a epiderme, com, em média, um décimo de milímetro, é estratificada. Sobre a face profunda da epiderme, ao nível da junção dermo-epidérmica, as células basais (*stratum germinatum*) regeneram continuamente o tecido epitelial queratinizado: em poucas semanas novas células migram à superfície, achatam-se e se queratinizam, cobrindo-se posteriormente com um filme lipídico e se deteriorando. A última etapa é a do dessecamento da camada superficial (*stratum corneum*), que elimina as células mortas por descamação. A camada suprabasal da epiderme (*stratum granulosum*) constitui os corpos mucosos de Malpighi, que contém, irregularmente distribuídas, as células melanocitárias, ou melanócitos. Na camada imediatamente acima (*stratum spinosum*) estão contidas as células de efeito imunitário, ou Células de Langerhans (Disponível em *Un tissu précieux,* em <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/menuFLASH.html> Acesso em 05/02/2006). A figura 1 mostra um corte transversal esquemático da pele.

A subcamada mais externa da epiderme, *stratum corneum,* é um tecido auto-reparador cuja principal função é servir de barreira primária contra agressões externas, sendo físicas ou químicas, e também ao ingresso de contaminantes e medicamentos. O *stratum corneum* é um tecido complexo sendo geralmente composto por 10 a 15 camadas de células queratinizadas anucleadas e achatadas incrustadas em uma matriz lipídica e sua espessura típica é de 10 μm quando seca (podendo atingir várias vezes sua espessura quando umedecida) (BARRY, EDWARDS e WILLIAMS, 1992, 1994). Sua composição média (massa seca) é de 75-80% de proteína, 5-15% de lipídios e 5-10% de material não-identificado (BARRY, EDWARDS e WILLIAMS, 1994).

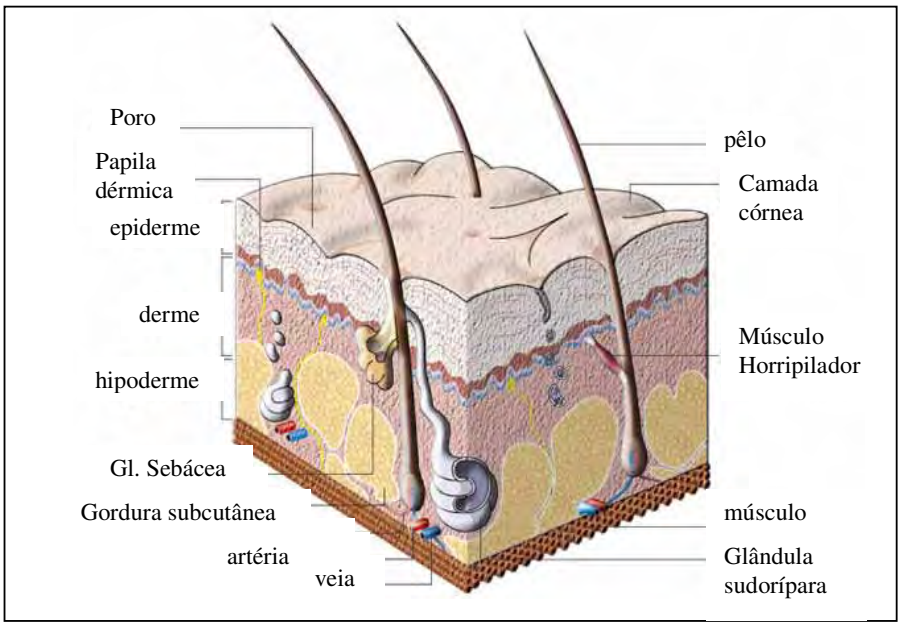


Figura 1- Esquema explicativo da constituição da pele.
(http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/menuFLASH.html, em *Derme et epiderme*, acesso em 20/11/04).

A pele representa 10% da massa do corpo humano. Ela deve suas textura e resistência às camadas teciduais que a constituem. Com uma espessura de menos de 5 mm, a derme e a epiderme contêm moléculas naturais de proteção (queratinas), coloração (melaninas) e nutrição (poliglicosídeos, lipídios e vitaminas) (Disponível em *Morphologie et constituants de la peau*, em <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/menuFLASH> Acesso 05/02/2006).

As queratinas são um grupo especial de proteínas fibrosas estruturais (BARRY, EDWARDS e WILLIAMS, 1994; 1995). Em humanos, sua síntese é limitada a três tecidos extra-dérmicos: cabelo, unha e epiderme, limitando-se, no caso da última, apenas à sua sub-camada mais externa. A fração protéica destas células consistem, predominantemente, em 70% α-queratina, 10% de β-queratina e 5% de membranas celulares (BARRY, EDWARDS e WILLIAMS, 1994). As queratinas são misturas complexas de proteínas ricas em cisteína,

aminoácido que contém enxofre em sua cadeia lateral, tendo portanto, como forma de estabilização de sua estrutura as chamadas pontes dissulfeto (-S-S-) intercadeias.

Os efeitos de distúrbios dermatológicos na qualidade de vida são freqüentemente subestimados e não totalmente entendidos. Desta forma, é importante investigar as propriedades dessa barreira para que com o conhecimento mecanístico e físico-químico seja possível desenvolver medicamentos de uso tópico, bem como cosméticos, mais efetivos (HADGRAFT, 2004). Hoje em dia, técnicas de imagem tridimensional possibilitam a análise do relevo da pele humana permitindo discernir alterações mínimas e fornecer informações qualitativas e, sobretudo, quantitativas acerca do envelhecimento fisiológico, até mesmo induzindo o uso de diversos agentes terapêuticos, antes mesmo das alterações se tornarem visíveis a olho nu e enquanto ainda se trata de um processo reversível.

Estudos da morfologia cutânea mostram o aparecimento de sulcos profundos e rugas em função do tempo, levando à perda de tonicidade, devido parcialmente à atrofia dos tecidos de sustentação da pele e perda de elasticidade da malha de colágeno (Figura 2).

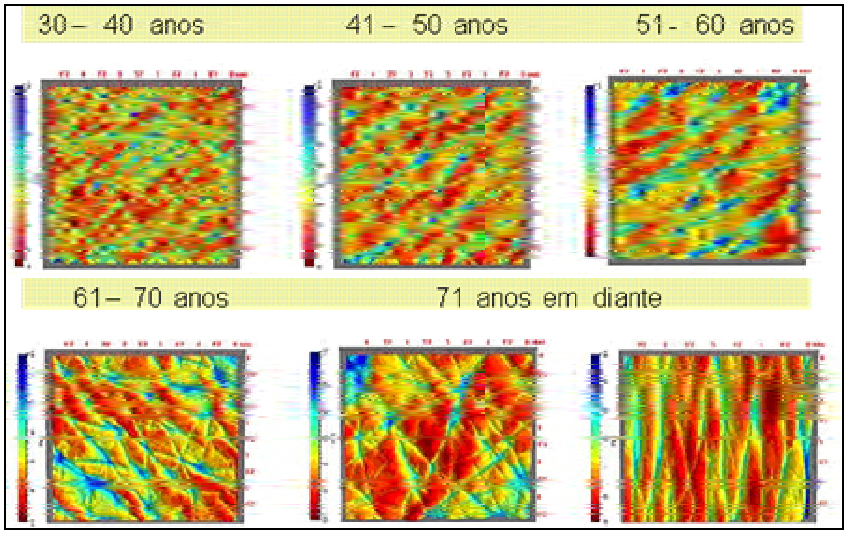


Figura 2 - Etapas de envelhecimento da pele. Análise através de imagem tridimensional. http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/menuFLASH.html, *Vieillissement de la peau*, acesso em 05/02/2006.

Essas mudanças são principalmente o resultado de radiações solares e solicitações mecânicas, entre outros fatores, sofridas pela pele e de uma programação genética da idade do indivíduo (Disponível em *Analyse du relief cutané*, em <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/menuFLASH> Acesso 05/02/2006).

Neste contexto, diversos métodos foram desenvolvidos a fim de retardar ou mesmo retroceder o processo de envelhecimento cutâneo, principalmente facial, dentre eles podem ser citados cirurgias plásticas e as técnicas de *peeling* químico e físico (dermabrasão).

1.2. Técnicas de *peeling*

1.2.1 Histórico

As técnicas de *peeling*, tanto físico (dermabrasão) quanto químico, encontram seu berço na Antigüidade. Os antigos egípcios usavam partículas de alabastro - variedade de gipsita ou calcita - associadas a leite e mel, para friccionar a pele do rosto, enrijecendo-a. Substâncias como ácidos, minerais, enxofre, e mostarda; fogo; produtos ásperos como lixas, pedra calcária e substâncias extraídas de plantas eram usadas para reduzir rugas faciais e reverter processos associados ao fotoenvelhecimento (LAWRENCE, 2000).

Em 1905, Kromayer foi o pioneiro no procedimento cirúrgico, hoje conhecido como dermabrasão. O Dr. Kromayer usava "lixas" para o tratamento de queratoses, cicatrizes de acne e desequilíbrios de pigmentação, observando que o restabelecimento após o tratamento estava relacionado com a profundidade atingida pelo procedimento, e notou ainda que quando se atingia apenas a camada superficial da pele, o restabelecimento ocorria sem aparecimento de cicatrizes (ASOCIACIÓN ARGENTINA DE CLÍNICA ESTÉTICA).

O interesse pelo procedimento cirúrgico se intensificou após a Segunda Guerra Mundial, à medida que foram feitas muitas tentativas para amenizar os traumas físicos devido aquele conflito. Durante os anos 40 e 50, a literatura médica estava repleta de descrições

relacionadas ao uso de dermabrasão. Durante este período o *peeling* químico ficou adormecido, não recebendo a mesma atenção pela comunidade médica já que não era aplicável aos casos de cicatrizes. Mas ainda no século XX o interesse neste tipo de revitalização cutânea ressurgiu após a reportagem de MacKee sobre o uso do fenol no tratamento de cicatrizes acnéicas (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) e aos poucos o público retomou o interesse, pois a mídia passou a reportar a descoberta de uma "fonte da juventude".

No fim dos anos 60, cirurgiões plásticos e dermatologistas começaram a investigar cientificamente os agentes químicos como o fenol e o ácido tricloroacético (TCA) para uso em rejuvenescimento facial. Depois disso, em 1972, Baker, Gordon e Stuzin (1993) demonstraram os resultados benéficos alcançados com o fenol a um grupo de cirurgiões plásticos. Desde então, o rejuvenescimento facial tem sido muito aceito pela comunidade médica (MENDELSOHN, 2002) e a fórmula determinada por Baker, dez anos antes, em 1962, tem sido, e ainda hoje continua sendo, a mais utilizada.

1.2.2. *Peeling* de fenol

O procedimento do *peeling* químico consiste na aplicação de um ou mais agentes esfoliantes sobre a pele para obter, primeiramente, destruição e posterior regeneração da epiderme, produzindo efeitos também a nível dérmico, acelerando o processo natural de esfoliação (GERSETICH et al., 1997; MENDELSOHN, 2002). Esta técnica produz um ferimento controlado determinando a renovação cutânea com redução ou desaparecimento de cicatrizes de acne, manchas, rugas e depressões superficiais (GERSETICH et al., 1997).

O fenol representa o agente de *peeling* químico profundo mais comum, gerando resultados dramáticos através da produção controlada de queimadura química ao nível da camada basal da epiderme, induzindo a inflamação da derme. À medida que o

restabelecimento ocorre, uma nova camada de colágeno estratificada é depositada, resultando pele com aparência mais jovem. O fenol tem se mostrado um agente efetivo na reversão do envelhecimento facial e mudanças de pigmentação irregular relacionadas à exposição solar e ao processo natural de envelhecimento.

Apesar de não ter tido ainda seu mecanismo desvendado, o *peeling* químico de fenol vem sendo realizado há algum tempo por cirurgiões plásticos. O tratamento é realizado em clínicas especializadas, não sendo um procedimento apenas ambulatorial. Na figura 3 é possível visualizar as etapas do tratamento em uma paciente de setenta e dois anos de idade.



Figura 3 – Fotografias de paciente de 72 anos de idade em diferentes fases do tratamento. a) antes da aplicação da amostra comercial (Multipeel), b) 24h após a aplicação, c) 48h, d) 4 dias, e) 7 dias, f) 14 dias, g) 20 dias e, h) 20 dia depois do tratamento (figura 25g ampliada). (Fotografias fornecidas por Dr. Lecy Marcondes Cabral, membro titular do Colégio Brasileiro de Cirurgiões).

Antes do tratamento a paciente apresentava fotoenvelhecimento acentuado em toda a face. Um dia após a aplicação (figura 3b) a paciente apresentava edema acentuado com início

de necrose. Após 48 horas (figura 3c) o processo necrótico se acentuou bastante iniciando também o processo de descamação. Ao quarto dia após a aplicação do agente de *peeling* (figura 3d) o edema já está visivelmente reduzido, mas com aparecimento de eritema e descamação intensa. Ao sétimo dia (figura 3e) o processo de descamação havia se completado, restando apenas eritema acentuado em toda a face e região do pescoço submetida ao tratamento. Duas semanas depois da aplicação (figura 3f) restava apenas eritema leve em toda a região submetida ao tratamento e após o tratamento (figura 3g e 3h) a paciente já estava totalmente recuperada, com redução visível das rugas.

Foram realizados ainda alguns ensaios preliminares de histologia (com pacientes do Dr. Lecy Marcondes Cabral) submetidos ao tratamento de *peeling* de fenol. Os fragmentos de pele para os estudos foram retirados da região pré-auricular por um *punch* de aproximadamente dois milímetros. Os cortes foram corados por hematoxilina/eosina e podem ser vistos na figura 4.

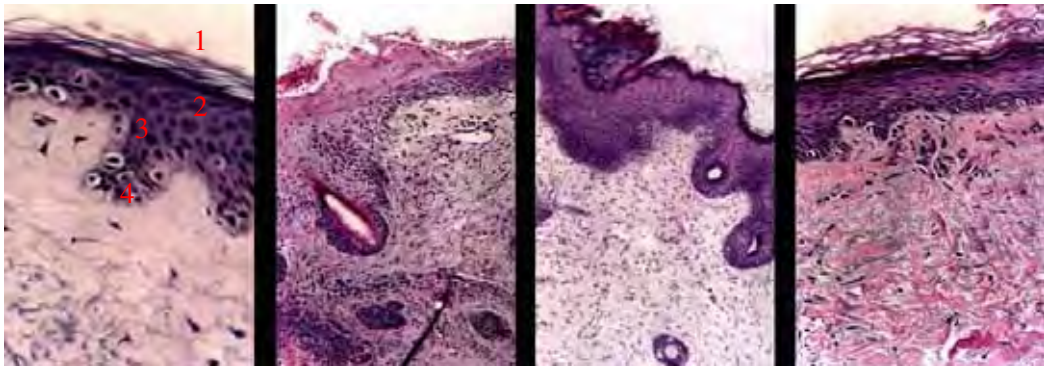


Figura 4 – Micrografias dos cortes histológicos de pele humana. a) corte controle, b) 4 dias após aplicação, c) 7 dias após aplicação e, d) 30 dias após aplicação.

Na figura 4a, corte controle, é possível visualizar as quatro subcamadas da epiderme e a derme. A subcamada 1 corresponde ao *stratum corneum*. A subcamada 2 é o *stratum granulosum*. A subcamada 3, *stratum spinosum* e a subcamada 4 é o *stratum germinatum*.

Abaixo da epiderme é possível visualizar a derme, tecido conjuntivo apresentando escassos filamentos de colágeno (feixes rosados).

Ao quarto dia é possível notar que houve total destruição da camada superior da epiderme, produzindo material necrótico e desarranjo desta camada até sua subcamada inferior, sem, contudo, perder a definição da interface epiderme/derme. Uma vez que a estrutura da derme foi visivelmente alterada, mas a interface epiderme/derme ainda se faz presente, pode-se inferir que uma reação inflamatória nesta camada foi induzida.

Ao sétimo dia a reestruturação das camadas é notável, com as subcamadas da epiderme já se diferenciando novamente e ao trigésimo dia a epiderme já se apresenta bastante estratificada, com maior número de camadas de células e a derme com grande quantidade de colágeno.

O colágeno é uma das estruturas responsáveis pela sustentação da pele e sua elasticidade. Desta forma, a grande quantidade de colágeno produzida após o tratamento explica a reversão efetiva do processo de fotoenvelhecimento.

No entanto, esta técnica tem sido realizada empiricamente, sem o conhecimento do mecanismo reacional nem o embasamento científico necessário para garantir a segurança e o sucesso do procedimento, permanecendo sempre uma margem para possíveis efeitos adversos não previstos, uma vez que o fenol é conhecidamente cardiotóxico, hepatotóxico, e nefrotóxico, podendo apresentar ainda efeitos colaterais locais.

1.2.2.1. Indicações

Assim como em qualquer procedimento estético, a própria seleção do paciente, individualizando o tratamento, é indispensável para a obtenção de sucesso. Apenas a habilidade técnica não é o suficiente, podendo levar a resultados indesejáveis ou até desastrosos, caso não seja realizada uma triagem detalhada antes do procedimento

(MENDELSOHN, 2002; GERSETICH et al., 1997). Para tanto, há um critério de classificação dos pacientes em quatro tipos distintos de acordo com as características da pele, relacionadas ao envelhecimento, simplificando a indicação do tratamento adequado (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação da pele de acordo com o envelhecimento. Parâmetro para a realização de diferentes tipos de *peeling*.

Tipo de pele	Características da pele
I	Sem rugas, tipicamente com menos de 35 anos
II	Rugas apenas aparecem quando há movimentação na face (por exemplo, ao sorrir), tipicamente entre 25/35 anos, cor amarelada e com sinais de dano solar precoce
III	Rugas mesmo com a face em repouso, especialmente ao redor dos olhos, boca e testa, idade entre 30/65 anos, descoloração, e aparecimento de pequenos vasos sangüíneos
IV	Severo envelhecimento, com muitas rugas profundas

Fonte: adaptado de http://www.biomodulacaocorporal.com.br/peeling_quimico.htm

A princípio, o *peeling* químico é uma técnica bem sucedida na erradicação de rugas profundas e alterações pigmentárias causadas por exposição solar crônica, pílulas contraceptivas ou gravidez.

Ao critério de classificação apresentados na tabela 1, é ainda associado o Critério de Classificação de Fitzpatrick (RUBIN, 1992; MENDELSOHN, 2002), já muito conhecido e utilizado para determinação do fator de fotoproteção adequado, resumido na tabela 2.

Tabela 2 - Sistema de Classificação de Fitzpatrick.

Tipo	Cor da pele	Características da pele
I	Branca	Sempre queimada, nunca bronzeada.
II	Branca	Usualmente queimada, menos bronzeada que a média.
III	Branca	Ligeiramente queimada, razoavelmente bronzeada.
IV	Branca	Raramente queimada, mais bronzeada que a média.
V	Parda	Raramente queimada, profusamente bronzeada.
VI	Negra	Nunca queimada, profundamente pigmentada.

Jon E. Mendelsohn, MD, Update on chemical Peels, Otorrynolaringologic Clinics of North América, v.35, n.1, february 2002, pp 55-72.

Este critério pode ser utilizado em associação uma vez que o processo determinante do envelhecimento facial se deve às reações ocorridas na pele, alterações fisiológicas e químicas, devidas à exposição à radiação ultravioleta. Os pacientes que se enquadram melhor no tipo de tratamento mais drástico que engloba o *peeling* de fenol, são aqueles definidos como tipo IV, e até alguns pacientes tipo III, pelo critério de envelhecimento da pele e tipo I pelo critério de Fitzpatrick (RUBIN, 1992; MENDELSOHN, 2002). Contudo, esses pacientes não são os únicos necessitados de tratamentos para marcas profundas.

Os *peelings* parciais, ou seja, em regiões limitadas da face, são realizados com melhores resultados em pacientes tipo I (Fitzpatrick), visto que não há demarcação resultante da diferença de coloração na face. Mas para pacientes tipo II ou com tipos de pele mais escura e em pacientes com danos significativos causados por acne, os resultados são melhores quando o procedimento é realizado em toda a face, evitando estas linhas de demarcação.

De qualquer maneira, o *peeling* de fenol não é a melhor opção para pacientes classificados como tipos I, II e alguns do tipo III pelo critério de classificação de acordo com o envelhecimento facial. Da mesma forma, o procedimento ficaria limitado para os pacientes com tipos de pele IV, V ou VI, pelo critério de Fitzpatrick, podendo apresentar manchas hiper ou hipopigmentadas após o tratamento (MENDELSOHN, 2002).

1.3. Toxicidade

Toxicidade é definida como a capacidade de certas substâncias causarem danos a seres vivos (PINTO et al., 2003). Uma consideração datada de meados de 1500 e atribuída a Philip Theophrastus Bombast Von Hohenhein ou Paracelsus é:

> Todas as substâncias são venenosas. Apenas a sua dosagem determina o envenenamento.

A evolução histórica mostra o emprego de espécies animais na avaliação de riscos para seres humanos, na maioria dos casos, apesar de diferentes situações, bem sucedido. No entanto, pode haver divergências para alguns casos, podendo haver conseqüências graves, como o episódio da talidomida, nos anos 50, evidenciando a variabilidade da resposta de certos fármacos, após a utilização em alguns animais para prever riscos de toxicidade humana (PINTO et al., 2003).

Apesar das diferenças existentes entre qualquer espécie e o homem, no que diz respeito à absorção, distribuição, biotransformação e eliminação, e da variabilidade interespécie ser mais regra do que exceção é sempre preferível a resposta de um modelo vivo à qualquer outro (PINTO et al., 2003).

1.3.1. Transaminases: AST e ALT

Enzimas são proteínas capazes de catalisar a conversão de um composto (substrato) em outro (produto) (MICHAL, 1999), podendo ou não necessitar de um cofator ou coenzima para tornar-se ativa.

As enzimas são divididas em classes de acordo com suas funções, ou seja, de acordo com o tipo de reação que catalisam, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Classes de enzimas segundo a classificação da IUB e atividade que catalisam.

Classe	Nome da classe	Atividade catalisada
EC1	Oxirredutases	Reações de oxirredução, transferência de H, O ou elétrons
EC2	Transferases	Transferências de grupos funcionais entre moléculas
EC3	Hidrolases	Reações de hidrólise
EC4	Liases	Adição de grupos a ligações duplas e vice-versa
EC5	Isomerases	Reações de isomerização
EC6	Ligases	Ligações acopladas à hidrólise de ATP

Fonte: adaptado de Lehninger, Nelson e Cox (1995)

As enzimas de interesse diagnóstico são constituintes celulares de alguns tecidos específicos. Elas podem fazer parte tanto da membrana celular, como de organelas ou do conteúdo citossólico. Constantemente estas enzimas estão sendo liberadas na corrente sangüínea e, da mesma forma, são retiradas do sangue. Em condições normais, existe um equilíbrio entre a velocidade de seu catabolismo e seu anabolismo. A simples detecção de atividade enzimática não é suficiente para o diagnóstico, uma vez que a presença de enzimas no sangue é, portanto, considerada normal. A atividade catalítica só tem significado clínico quando os valores encontrados ficam fora dos valores normais de referência.

O incremento da atividade enzimática tecidual normalmente está associado ao aumento da síntese da enzima no tecido de origem, à diminuição do catabolismo ou à proliferação celular, enquanto o decréscimo ocorre pelos fatores inversos (diminuição da síntese, aumento da degradação), pela inativação enzimática ou carência de cofatores (GELLA, 1994). Isto pode ocorrer por causas fisiológicas, patológicas ou terapêuticas. O aumento da liberação de enzimas à corrente sangüínea pode ocorrer por morte celular, aumento de permeabilidade da membrana ou pela proliferação celular.

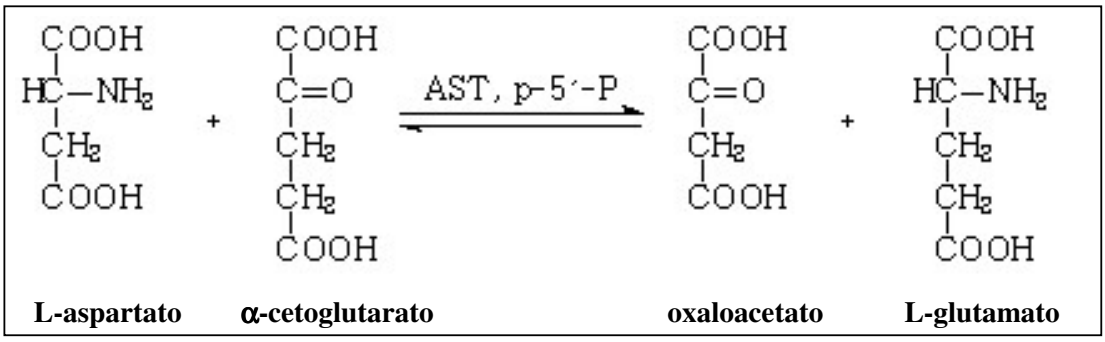
Dentro da classe 2 das transferases, estão as transaminases, encontradas principalmente no fígado, coração e rins. Elas são responsáveis pela transferência de um grupo amino de um aminoácido para um cetoácido com a formação de um cetoácido proveniente do aminoácido original e de um aminoácido proveniente do cetoácido original.

O piridoxal-5'-fosfato é o grupo prostético (coenzima) das transaminases e participa na transferência de aminogrupos. Sua interação com a apoenzima favorece a ligação da amina do primeiro substrato formando piridoxamina-5'-fosfato, a qual permanece ligada à enzima, liberando o primeiro produto da reação. A seguir, esta co-enzima, na forma amínica, transfere sua amina ao segundo substrato, formando o segundo produto (MOSS e HENDERSON, 1999; BELL et al., 1959).

As transaminases estão amplamente distribuídas nos tecidos humanos, sendo encontradas normalmente no plasma, bile, líquor, saliva e, somente em caso de lesão renal, na urina (MOSS e HENDERSON, 1999). Sua elevação no soro sangüíneo ocorre nos casos de doenças hepáticas e cardiopatias (MOSS e HENDERSON, 1999).

1.3.1.1 Aspartato aminotransferase (AST)

A Aspartato aminotransferase (AST) ou Transaminase Glutâmico Oxaloacética (TGO) catalisa a transferência de um grupo amino entre aspartato e α-cetoglutarato formando oxaloacetato e glutamato, como mostra o esquema 1.



Esquema 1 - Reação catalisada pela AST.

A reação é reversível e *in vivo* o equilíbrio é dependente da necessidade do órgão na qual está contida, sendo favorecida a formação do glutamato no tecido cardíaco e desfavorecida no fígado, podendo servir como fonte de nitrogênio para o ciclo da uréia, com a deaminação do glutamato, via glutamato desidrogenase (PRICE e STEVENS, 1999).

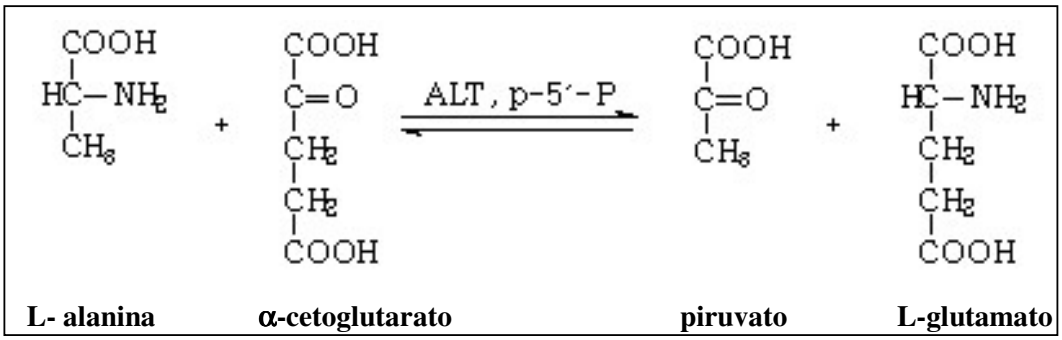
A AST é uma enzima dimérica com duas subunidades idênticas. A massa molecular da holoenzima do tecido hepático humano é de 93 kDa e seu ponto isoelétrico varia de 5,15 a 5,80. Apresenta polimorfismo com as formas mitocondriais e citoplasmáticas (REG, 1984), onde a forma citoplasmática representa 81% do total da AST no tecido hepático humano (MOSS e HENDERSON, 1999; REG, 1978). A isoenzima citoplasmática é predominante no soro quando há condições associadas a uma lesão branda no tecido hepático, não extinguindo

a presença da forma mitocondrial, uma vez que esta é marcadora de uma lesão tecidual recente (MOSS e HENDERSON, 1999; MURRAY, 1987).

A AST pode ser usada para avaliar lesão hepática em pequenos animais da mesma forma que a ALT, porém com especificidade menor, podendo ser detectada em maior atividade após lesões no músculo cardíaco. Quando estiver presente congestão hepática por problema cardíaco, a enzima provavelmente estará elevada, devido ao fígado congesto (BUSH, 1991). O aumento da AST sérica também pode ocorrer em patologias de localização no sistema nervoso central (NAZIFI et al., 1997).

1.3.1.2. Alanina aminotransferase (ALT)

A Alanina aminotransferase ou Alanina Transaminase (ALT) ou Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP) catalisa a transferência de um aminogrupo da L-alanina para o α-cetoglutarato, formando piruvato e L-glutamato, conforme mostrado no esquema 2.



Esquema 2 - Reação catalisada pela ALT.

A reação é reversível e *in vivo* há a formação do piruvato que dá origem à acetil-CoA que participa do ciclo do ácido cítrico, e o glutamato, novamente, sendo uma fonte de nitrogênio para o ciclo da uréia, com sua deaminação, via glutamato desidrogenase (PRICE e STEVENS, 1999; MURRAY, 1987).

A distribuição tissular da ALT, observada em atividade/g de tecido, tem no fígado um dos valores mais elevados, embora seja também encontrada, como a AST, em outros tecidos e

líquidos como sangue, bile, líquor e saliva. (MOSS e HENDERSON, 1999; PRICE e STEVENS, 1999; MURRAY, 1987).

Mesmo não sendo uma enzima hepato-específica é utilizada, com outros marcadores, para o auxílio diagnóstico nas hepatopatias (MOSS e HENDERSON, 1999; MURRAY, 1987), uma vez que seus níveis no soro se tornam elevados sempre que a integridade da célula hepática é afetada. De qualquer forma, para a detecção de danos hepáticos em pequenos animais é o melhor teste (BUSH, 1991).

O aumento da ALT está relacionado com o número de células envolvidas, ou seja, com a extensão, e não com a gravidade da lesão. Diversos fármacos podem induzir um incremento da atividade sérica da ALT. Em pequenos animais são mais relevantes: acetaminofeno, barbitúricos, glicocorticóides,, cetoconazol, mebendazol, fenilbutazona, primidona e tetraciclina (WILLARD et al, 1993; SPINOSA et al, 1999). Algumas outras substâncias químicas como fenóis, alcatrão entre outros, plantas hepatotóxicas e aflatoxina podem causar o mesmo efeito (OSWEILER, 1998). Na hepatite viral e outras formas de doença hepática associada com a presença de necrose, os níveis séricos das transaminases tornam-se elevados antes mesmo dos sinais clínicos aparecerem. Elevações da atividade de ALT raramente são observadas em doenças ou distúrbios não-hepáticos (MOSS e HENDERSON, 1999; PRICE e STEVENS, 1999; HORNBROOK et al, 1982).

1.3.2. Creatina quinase (CK)

As células musculares e nervosas, que possuem uma elevada reciclagem de ATP, dependem de fosfoguanidinas para regenerarem ATP rapidamente. O grande potencial de transferência de grupo fosfato das fosfoguanidinas, como a fosfocreatina e a fosfoarginina, é devido, principalmente, à competição entre as ressonâncias no grupo guanidino, que são ainda

mais pronunciadas do que nos grupos fosfato ou anidrido fosfórico (VOET et al., 2000), como é mostrado na figura 5.

Conseqüentemente, a fosfocreatina pode transferir seu grupo fosfato para o ADP, formando ATP.

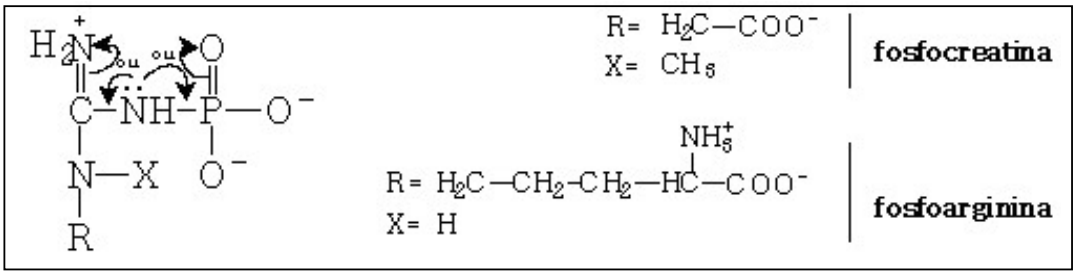
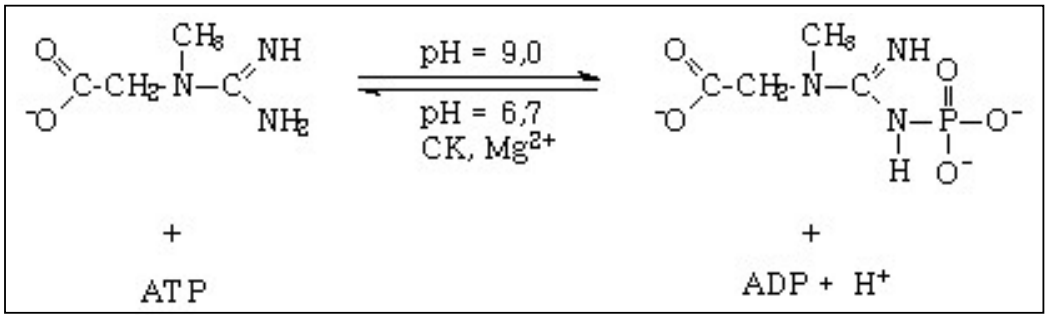


Figura 5 – Estrutura das fosfoguanidinas. (VOET et al., 2000)

Nos vertebrados a fosfocreatina é sintetizada pela fosforilação reversível da creatina pelo ATP, reação esta catalisada pela enzima creatina quinase, conforme mostrado no esquema 3.



Esquema 3 - Reação catalisada pela CK.

Quando a célula está em repouso, quando a concentração de ATP ([ATP]) é relativamente alta, a reação ocorre no sentido de formação de fosfocreatina, ao contrário de quando a atividade metabólica é alta, tendo [ATP] baixa, há a produção de ATP a partir da fosfocreatina e ADP. Assim, a fosfocreatina atua como um modulador nas células que contêm CK, já que a enzima catalisa a refosforilação do ADP a fim de obter ATP a partir da fosfocreatina (MOSS e HENDERSON, 1999; PRICE e STEVENS, 1999), mantendo a concentração do ATP citossólico relativamente constante.

Além da função da enzima no citossol, há fosfocreatina também na mitocôndria, onde a CK faz o papel inverso, desfosforilando o ATP, transferindo o grupo fosfato, desta vez, para a creatina formando fosfocreatina e esta sendo lançada ao citossol para ser utilizada como substrato da CK citossólica. Esta função mitocondrial da CK é importante para o controle da respiração celular e do metabolismo aeróbico, enquanto a CK citossólica é crucial para o metabolismo anaeróbico e contração muscular (LEVIN et al., 1990).

O magnésio é cofator para esta enzima, contudo, se está presente em excesso atua como inibidor. Outros íons metálicos que também atuam como inibidores enzimáticos da CK são zinco, cálcio e cobre (MOSS e HENDERSON, 1999).

A CK é um dímero composto por duas subunidades, B ("brain") e M ("muscle"), cada uma com peso molecular de aproximadamente 40 kDa e são codificadas por dois genes distintos. Três pares diferentes de dímeros podem existir, sendo eles: BB (CK1), MB (CK2) e MM (CK3). As três isoenzimas podem ser encontradas no citossol das células ou associadas a estruturas microfibrilares. Existe ainda uma quarta isoenzima, mitocondrial, que difere das outras imunologicamente e na mobilidade eletroforética, sendo chamada de CK Mt, localizada nas membranas mitocondriais externas e internas e no tecido cardíaco, correspondendo a 15% de sua atividade total.

Considerando que a CK está relacionada com a função da massa muscular do indivíduo, há uma variação de sua atividade sérica entre homens e mulheres e também em organismos com pouca massa muscular (MOSS e HENDERSON, 1999; PRICE e STEVENS, 1999).

A atividade sérica da CK pode ser alterada em função de várias causas, como quando há injúria, inflamação ou necrose do músculo esquelético ou cardíaco e também por várias drogas em doses farmacológicas ou drogas de abuso (LOTT e LANDERSMAN, 1984). No entanto, esta enzima no soro é relativamente instável, e sua atividade é perdida em pouco

tempo como resultado da oxidação do grupo sulfidrila no centro ativo da enzima (MOSS e HENDERSON, 1999; NEUMEIER, 1981), tornando-se imprescindível a rapidez nas análises.

A tabela 4 mostra um resumo da função e distribuição desta enzima e das transaminases em questão no organismo.

Tabela 4 – Algumas enzimas de interesse diagnóstico, sua função, distribuição no organismo e fatores que alteram sua concentração.

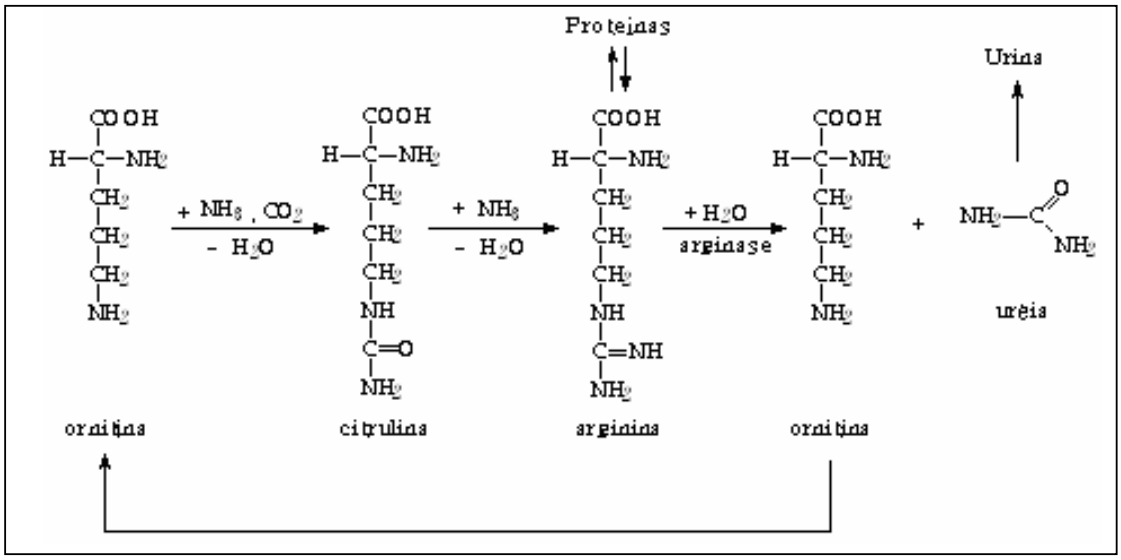
Enzima	Reação	Tecido	Fluidos Biológicos	Elevação da Atividade
AST	Transaminação	Hepático, cardíaco, muscular esquelético, renal	Plasma/soro, bile, líquor, saliva	Hepatite, cirrose, carcinomas, cardiopatias
ALT	Transaminação	Principalmente hepático	Plasma/soro, bile, líquor	Hepatopatias
CK	Transferência de grupos fosfato	Cardíaco, muscular esquelético	Plasma/soro	Miopatias, cardiopatias

Fonte: (MORI, 2002)

1.3.3. Uréia

O ciclo da uréia não é só uma maneira de remover amônia do organismo, sendo responsável também pela eliminação de CO_2. Em animais, plantas e bactérias, é também uma fonte de arginina (aminoácido proteinogênico), poliaminas e compostos guanidinos (MICHAL, 1999)

A conversão de amônia a uréia não é, portanto, uma simples combinação da primeira com dióxido de carbono e água para formar carbonato de amônia que é diretamente transformado em uréia. O processo é conhecido como Ciclo da uréia, ou Ciclo da ornitina-arginina. O aminoácido arginina é decomposto pela enzima arginase originando uma molécula de uréia e uma de ornitina. Amônia e dióxido de carbono se combinam com a ornitina e formam a citrulina, que adicionada a mais uma molécula de amônia resulta na formação de arginina e o processo se reinicia. O ciclo da uréia pode ser visualizado no esquema 4 e o anexo A mostra o metabolismo de proteínas e produção de uréia no fígado.



Esquema 4 - Produção de uréia no fígado.

Nos animais, os primeiros passos do ciclo da uréia se processam nas mitocôndrias das células hepáticas. Bollman, Mann e Magath realizaram estudos onde, primeiramente, removeram o fígado de cachorros, ocasionando no acúmulo de aminoácidos no sangue e na diminuição da excreção de uréia e de seu nível no soro sangüíneo.

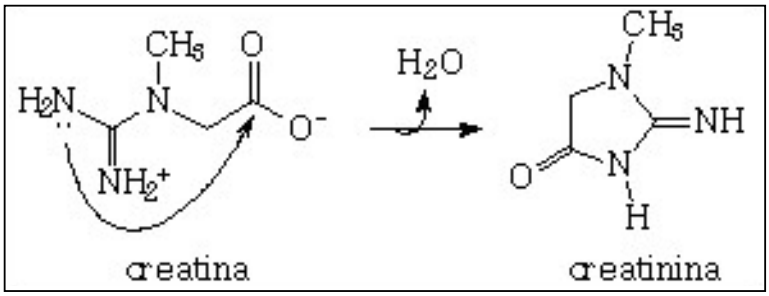
Em seguida, fizeram experimentos onde fígado e rins foram removidos. Nos casos em que os rins foram removidos antes, o nível de uréia no sangue aumentou bastante, aumento cessado após a retirada do fígado. Quando ambos foram removidos simultaneamente o nível de uréia no sangue ficou inalterado.

Estes estudos provam que a uréia é produzida no fígado, sendo apenas eliminada através dos rins, pela urina (BELL et al., 1959; MICHAL, 1999). Portanto, dependendo do perfil de concentração da uréia no soro sangüíneo é possível detectar possíveis danos hepáticos ou renais.

1.3.4. Creatinina

A creatinina é um produto do metabolismo da creatina, importante componente muscular. A fonte mais importante de energia no interior das células é o ATP, devido às suas

ligaçõs fosfato, altamente energéticas. Quando uma destas ligações é rompida, energia é fornecida à célula e a molécula de ATP se torna ADP. A creatina-fosfato representa uma fonte reserva de energia, uma vez que é responsável pela reconversão rápida de ADP a ATP. Uma vez doado o grupo fosfato à molécula de ADP, a creatina se degrada gerando creatinina, que é apenas descartada, não tendo nenhuma função celular ou metabólica. Esta por sua vez é excretada inteiramente pelos rins. O esquema 5 mostra a formação de creatinina à partir da degradação da creatina.



Esquema 5 – Degradação da creatina à creatinina.

Com a função renal normal, o nível sérico de creatinina se mantém constante, porém se ocorre algum dano a este órgão, nota-se como conseqüência o aumento deste nível no sangue devido à diminuição da excreção deste composto (http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003475.htm; http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003610.htm).

A alteração nos níveis de creatinina no soro sangüíneo se dá de duas formas: seu aumento pode indicar, entre outras causas, fluxo de sangue reduzido nos rins (choques ou falha cardíaca) ou falha renal e; sua diminuição pode indicar distrofia muscular (estágio final) ou miastenia grave (http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003475.htm; http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003610.htm).

2. OBJETIVOS

Diante das informações apresentadas, o presente trabalho visou à realização de um estudo sistemático para a elucidação do procedimento do *peeling* químico de fenol, determinando a composição da formulação comercialmente utilizada (Multipeel®), bem como seu mecanismo de ação e seus efeitos. Neste sentido, os objetivos do presente projeto foram divididos da seguinte maneira:

1. Análise química da formulação;
2. Proposição do mecanismo de reação pela mimetização da reação *in vitro* da amostra comercial (Multipeel®) com o modelo glutationa oxidada e pelos ensaios de FT-Raman;
3. Determinação da toxicidade do agente de *peeling*, pela análise de variação de atividade enzimática ou variação da concentração de metabólitos escolhidos como marcadores de hepato, cardio e nefrotoxicidade em coelhos (*Oryctolagus cunniculus*);
4. Análise do efeito do *peeling* a partir da avaliação dos cortes histológicos e FT-Raman de fragmentos de pele dorsal de camundongos (*Mus musculus*).
5. Proposição de nova formulação, a partir do mesmo princípio ativo, mas com efeito mais brando, podendo abranger uma gama maior de aplicações, como por exemplo, fotoenvelhecimento leve, marcas acnéicas entre outros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Identificação e quantificação dos componentes da amostra comercial

A identificação dos componentes da amostra comercialmente utilizada foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (HPLC-UV) e confirmada por ressonância magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C-RMN). A quantificação dos componentes da amostra foi realizada por CG-MS e HPLC realizadas no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP em Araraquara, com a colaboração do Dr. Juliano Cardoso e Dr. Alberto Camilo Alécio.

Os cromatogramas (CG) e espectros de massas foram obtidos por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas, modelo QP5050A da Shimadzu. A coluna utilizada foi SPB-1 (30 m, 0,25 mm ID, 0,10 μm espessura do filme) da Supelco. O gás de arraste utilizado foi N_2. A fonte de ionização utilizada foi impacto eletrônico, com energia de 70 eV. O scan de massas foi de 50,00 a 650,00 m/z. A temperatura do injetor foi fixada em 250ºC e do detector em 290ºC, o volume da amostra por injeção foi 0,5 μL, no modo split e com fluxo na coluna de 1,0 mL/min.

Para a identificação inicial da amostra a programação de temperatura foi de 40ºC a 250ºC com taxa de aquecimento de 5ºC/min. Para a quantificação do fenol a programação de temperatura foi de 40ºC a 115ºC com taxa de aquecimento de 5ºC/min. Após a identificação dos componentes da amostra, foi realizada a quantificação do fenol, utilizando-se padrão de fenol 88% (concentração usual em *peelings* usando fórmula de Baker), em etanol, preparado por farmácia de manipulação.

Os cromatogramas (HPLC) foram obtidos por cromatógrafo Shimadzu, utilizando sistema de bombas ternário LC-10AD com detector com arranjo de diodos SPDM-10A VP, injetor automático SIL-10A e módulo de comunicação CBM-10A. Utilizou-se fase reversa

com coluna Supelcosil C-18 (25 cm x 4,6 mm) com partículas de 5 µm da Supelco. Utilizou-se metanol (MeOH): água (H_2O): ácido acético (HAc) a 8:5,5:1 como sistema de solventes, em modo isocrático, com fluxo de 1,0 mL/min. A amostra foi analisada inicialmente em λ = 254 nm, para a identificação dos seus componentes e, posteriormente, em λ = 320 nm para a quantificação do ácido salicílico.

Os espectros de ressonância foram obtidos por espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian Inova 500, com freqüência de ressonância de 125 MHz. O solvente utilizado foi D_2O.

3.2. Ensaios biológicos

Foram realizados ensaios preliminares com camundongos (*Mus musculus*) com a finalidade de dominar o manuseio e as técnicas de tratamento, depilação e aplicação das amostras no dorso dos animais. Além disso, foram realizados ensaios para determinação de toxicidade cardíaca, hepática e renal em coelhos (*Oryctolagus cunniculus*) e estudo de Histologia, FT-Raman e OCT em camundongos (*Mus musculus*). Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, após aprovação do projeto pelo comitê de Ética em Pesquisa sob o protocolo CEP/FCF/Car. nº 37/2005.

3.2.1. Ensaios preliminares com camundongos

Foram utilizadas quinze fêmeas da espécie *Mus musculus* com 6 meses de idade. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais sendo controle, amostra comercial, padrão de fenol, padrão de ácido salicílico, e proposta de nova formulação (nova formulação A) com maior viscosidade – uma vez que se supunha que com maior viscosidade a permeação da amostra seria menor – preparada a partir da mistura da amostra comercialmente utilizada

adicionada de SiO_2 microparticulada (Aerosil®). Devido à massa de SiO_2 ser muito pequena e a análise preliminar ser apenas qualitativa, a quantidade exata adicionada à amostra não foi determinada, objetivando apenas atingir alta viscosidade.

O padrão de fenol, aplicado nos animais do grupo FE, foi preparado pela farmácia de manipulação Drogaderma, em São Paulo, em concentração igual a 88%, em etanol. O padrão de ácido salicílico aplicado nos animais do grupo AS, também preparado pela Drogaderma, apresentava-se em concentração de 30% (concentração normalmente utilizada para *peelings*), em etanol. Tanto o padrão de fenol quanto o de ácido salicílico foram aplicados nesta mesma concentração, uma vez que a quantificação da amostra comercial ainda não estava disponível para que fosse possível preparar diluições dos padrões a fim de equivaler suas concentrações individuais às da amostra comercial.

Foi feito acompanhamento visual dos grupos ao terceiro e sétimo dias após as aplicações.

3.2.2. Ensaios toxicológicos

Existem no organismo dos seres vivos diversas moléculas, enzimas, hormônios, ou mesmo moléculas mais simples, que são responsáveis pelo envio de sinais de um órgão ou glândula a outros. Estes sinais são de extrema importância, uma vez que cada parte do metabolismo dos seres vivos está diretamente ligada a todas as outras, e são chamados portanto de **marcadores biológicos**. Estes marcadores podem ser de natureza diversa e cada um indica um tipo de acontecimento dentro do metabolismo. Existem marcadores específicos de cada órgão que indicam se este órgão está em seu perfeito funcionamento ou se há alguma alteração funcional, indicando que pode ter havido um processo de intoxicação do indivíduo. Neste estudo de toxicidade aguda, foram realizados ensaios para determinação de cardio, hepato e nefrotoxicidade, utilizando-se como marcadores de toxicidade 3 enzimas: aspartato

aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatina quinase (CK); e 2 metabólitos: uréia e creatinina.

Foram utilizados para estes ensaios 20 coelhos da espécie *Oryctolagus cunniculus*, com 15 semanas de idade. Os animais foram depilados com máquina, conforme figura 6, e divididos em 5 grupos experimentais, sendo controle, amostra comercial, padrão de fenol a 55,15%, padrão de ácido salicílico a 12,73% e uma segunda proposta de nova formulação (nova formulação B), preparada a partir da amostra comercial adicionada de 10% de polivinilpirrolidona (PVP K90).

As análises dos marcadores AST, ALT, uréia e creatinina foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Regina Vendramini do Laboratório de Bioquímica do Núcleo de Apoio à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara.

As análises do marcador CK foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara.



Figura 6 – Procedimento de depilação de região dorsal dos coelhos a serem utilizados nos ensaios de toxicidade.

Os animais utilizados no grupo controle foram selecionados aleatoriamente do grupo de 20 animais e após a coleta do sangue foram divididos juntamente com os outros para formarem os grupos de análises.

A tabela 5 especifica o número de amostras colhidas em cada dia do procedimento, bem como a que grupo pertencem.

As determinações foram feitas a partir de soro sangüíneo, após centrifugação do sangue coagulado. O sangue foi extraído das orelhas dos animais, após sua imobilização em caixa de madeira, própria para o procedimento, conforme pode ser verificado na figura 7.

Tabela 5 - Quantidades de amostras para determinação da atividade (enzimas) ou da concentração (metabólitos) dos marcadores de toxicidade.

GRUPO	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 12
Controle	5	------	------	------
Amostra comercial	------	5	5	5
Padrão de fenol	------	5	5	5
Padrão de àcido salicílico	------	5	5	5
Nova formulação B	------	5	5	5



Figura 7 – Imobilização dos coelhos, em caixa de madeira própria para este procedimento, para coleta de sangue.

Para a coleta foram utilizadas agulhas descartáveis BD 25 x 8. A região a ser perfurada foi friccionada com algodão, para que houvesse a dilatação da veia, sendo umedecida em seguida com álcool etílico 70% para melhor visualização e desinfecção do local, tornando possível a coleta do fluido sangüíneo. O material foi coletado em frascos de vidro de 10 mL – sem a utilização de agentes anticoagulantes – e deixado em repouso por aproximadamente 1 hora, sendo 30 minutos à temperatura ambiente e 30 minutos em estufa à temperatura de 35ºC para que houvesse retração do coágulo, permitindo sua separação do soro. A figura 8 mostra o procedimento de coleta do sangue dos animais.



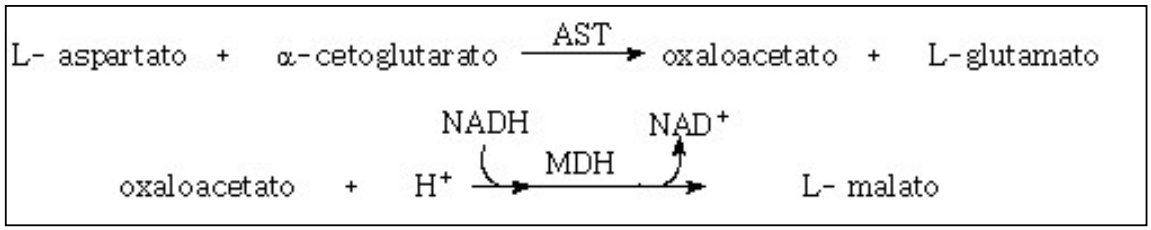
Figura 8 – Coleta de sangue dos coelhos para ensaios de toxicidade.

O soro foi separado do sangue, inicialmente por retração do coágulo e, em seguida, por centrifugação em centrífuga Excelsior, com rotação 2200 rpm durante 5 minutos. As amostras de soro foram transferidas para tubos plásticos com o auxílio de micropipetas e enviadas às análises toxicológicas.

3.2.2.1. Aspartato aminotransferase - AST

Foram realizadas determinações cinéticas da atividade enzimática de AST (ou Transaminase Glutâmico Oxaloacética - TGO) baseadas nas recomendações da IFCC (International Federation of Clinical Chemistry), utilizando kit Sera-Pak® Plus, específico para tais análises, seguindo o princípio no esquema 6.

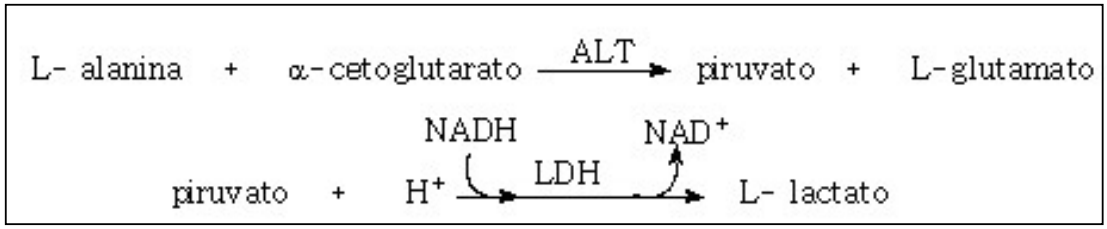
As análises foram realizadas em equipamento de automação RAXT da Technicon (Bayer). A absorbância das amostras foi medida em 340 nm, à temperatura de 30 a 37ºC.



Esquema 6 - Princípio do método de determinação de AST. *MDH – Malato Desidrogenase

3.2.2.2. Alanina aminotransferase - ALT

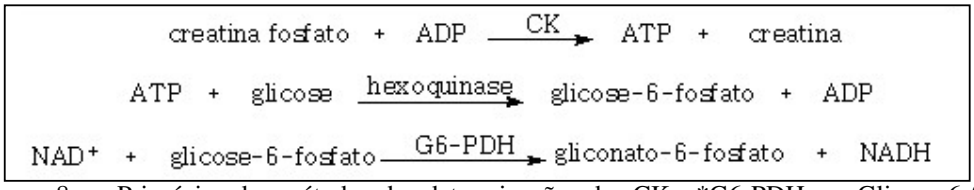
Foram realizadas determinações cinéticas da atividade enzimática de ALT (ou Transaminase Glutâmico Piruvato - TGP) baseadas nas recomendações da IFCC, utilizando kit Sera-Pak® Plus, específico para tais análises, seguindo o princípio apresentado no esquema 7. As análises foram realizadas em equipamento de automação RAXT da Technicon (Bayer). A absorbância das amostras foi medida em 340 nm, à temperatura de 30 a 37ºC.



Esquema 7 - Princípio do método de determinação de ALT. *LDH – Lactato desidrogenase

3.2.2.3. Creatina quinase - CK

Foram realizadas determinações cinéticas da atividade enzimática de Creatina Quinase (CK), utilizando kit Bioliquid da BioDiagnóstica, específico para tais análises, seguindo o princípio apresentado no esquema 8.



Esquema 8 - Princípio do método de determinação de CK. *G6-PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase

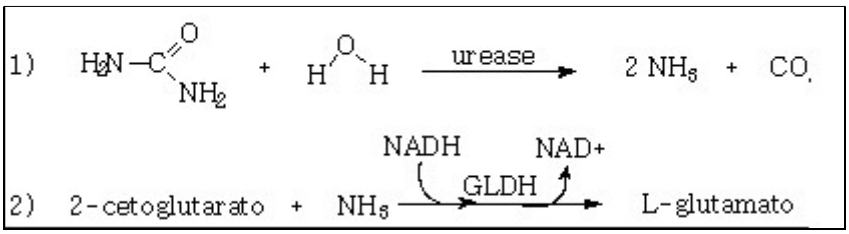
A velocidade de aumento na concentração de NADH, medida a 340 nm, é proporcional à atividade de CK na amostra.

Foram feitas quatro medidas de absorbância para cada amostra, sendo em zero, 1, 2 e 3 minutos.

As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis HP 8453, utilizando controlador de temperatura HP 89090A e software HP 845X, da HP.

3.2.2.4. Uréia

Foram determinadas as concentrações de uréia por técnica fotométrica, pelo método de cinética em ponto final, utilizando kit LABTEST da DIAGNÓSTICA específico para tais análises, seguindo o princípio apresentado no esquema 9.



Esquema 9 - Princípio do método de determinação de uréia. * GLDH – Glutamato desidrogenase.

As análises foram realizadas em equipamento de automação RAXT da Technicon (Bayer). A absorbância das amostras foi medida em 340 nm, à temperatura de 30 a 37ºC.

3.2.2.5. Creatinina

Foram determinadas as concentrações de uréia por técnica fotométrica, pelo método de cinética em ponto final, utilizando kit LABTEST da DIAGNÓSTICA específico para tais análises, seguindo o princípio apresentados no esquema 10.

Creatinina + picrato alcalino ⟶ picrato de creatinina

Esquema 10 - Princípio do método de determinação de creatinina.

As análises foram realizadas em equipamento de automação RAXT da Technicon (Bayer). A absorbância das amostras foi medida em 510 nm, à temperatura de 37ºC.

3.2.3. Espectrometria Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman)

A espectrometria Raman, sendo um método de espectrometria vibracional, é capaz de fornecer informações detalhadas sobre a substância em estudo, permitindo sua identificação inequívoca. Isso ocorre devido às vibrações de cada ligação química terem freqüência e intensidade características, e dependentes também do meio em que esta molécula se encontra, podendo interagir com moléculas vizinhas ou com o próprio meio. Desta forma, o espectro vibracional de uma substância passa a ser sua impressão digital, ou seja, fornece diversas informações sobre a molécula permitindo inferir sobre sua estrutura, bem como as alterações sofridas (FARIA e SOUZA, 2005).

Foram utilizados para os ensaios de FT-Raman 65 camundongos machos da espécie *Mus musculus* com 6 meses de idade. Os animais foram divididos em grupos experimentais, recebendo aplicações de amostras específicas para cada grupo, conforme descrito na tabela 6.

Tabela 6 – Divisão dos animais entre os grupos experimentais para as análises de FT-Raman, OCT e Histologia.

GRUPO	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 12
Controle	5	------	------	------
Amostra comercial	------	5	5	5
Padrão de fenol	------	5	5	5
Padrão de àcido salicílico	------	5	5	5
Nova formulação C	------	5	5	5

Os animais foram depilados manualmente, conforme figura 9, e divididos em 5 grupos experimentais, sendo controle, amostra comercial, padrão de fenol a 50% padrão de ácido salicílico a 13% e uma terceira proposta de nova formulação (nova formulação C), composta de 15% de fenol, 6% de ácido mandélico e 0,5% de prilocaína em meio de etanol.



Figura 9 – Procedimento de depilação da região dorsal de camundongos utilizados nos ensaios de FT-Raman, Histologia e OCT.

Após os períodos determinados previamente, e equivalentes aos períodos críticos do processo de inflamação aguda, os animais tiveram um fragmento de aproximadamente 2 cm^2 de área da região dorsal superior extraído, como mostra a figura 10.



Figura 10 – Extração dos fragmentos de pele, da região dorsal dos camundongos, analisados por FT-Raman, Histologia e OCT.

Os fragmentos de pele do dorso dos animais foram divididos em 3 partes e enviados às análises de espectrometria Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman), histologia e tomografia por coerência óptica (OCT). Após a extração os fragmentos destinados às análises de FT-Raman foram colocados em cassetes, embalados em recipiente fechado e levados ao freezer, onde foram conservados a temperaturas menores que -10^oC até sua análise.

As análises foram realizadas em Espectrômetro Raman Bruker RFS100/S, figura 11, com laser de Nd:YAG com λ=1064 nm. O spot na amostra foi de 100 μm, resolução e 4 cm^{-1} e potência na amostra de 350 mW.

Para esta técnica contou-se com a colaboração com o grupo do Prof. Dr. Edson Roberto Leite, do LIEC (Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica) da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos/SP.



Figura 11 – Espectrômetro Raman Bruker RFS100/S

3.2.4. Ensaios histológicos

A histologia é o método clássico para visualização de estruturas a nível celular em tecidos de qualquer natureza. A possibilidade de se obter uma fotomicrografia é uma das grandes vantagens, pois possibilita a identificação de estruturas celulares presentes no tecido analisado de maneira muito segura. Existem diferentes tipos de colorações a serem realizadas a fim de que as estruturas desejadas sejam destacadas nas lâminas, oferecendo uma gama muito grande de possibilidades de estruturas a serem analisadas.

As análises de histologia foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho, da Faculdade de Odontologia da UNESP, Araraquara/SP.

Os fragmentos de pele foram submetidos ao tratamento apropriado para a confecção dos blocos a serem cortados para a preparação das lâminas. Imediatamente após a extração os fragmentos foram colocados em cassetes, próprios para o procedimento e imersos em formol,

onde permaneceram por 3 dias. Em seguida foram lavados em água corrente por 12 horas, seguindo por imersão em etanol 70% por 24 horas, etanol 80% por 1 hora, etanol 90% por 1 hora, etanol absoluto por 4 horas e finalmente em etanol/xilol (1:1) por mais 2 horas. É importante salientar que ao final do procedimento os fragmentos deveriam estar defanizados (transparentes), caso contrário seria necessária a permanência na última solução por mais tempo, até que a defanização seja atingida.

Ao final deste procedimento os fragmentos, ainda dentro dos cassetes, foram imersos em parafina líquida a 58-62^{o}C e levados à estufa à mesma temperatura por 1 hora. Ao serem retirados da estufa foram transferidos para outro recipiente contendo parafina onde são mantidos por 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram novamente transferidos para mais dois recipientes contendo parafina líquida, à temperatura mais elevada, onde permaneceram por mais 1 hora quando, então, deu-se início à confecção dos blocos.

Para a inclusão dos fragmentos nos blocos utilizou-se equipamento inclusor Myr modelo AP280-1, AP280-2 e AP280-3 (Figura 12).



Figura 12 - Equipamento inclusor dos fragmentos de pele em parafina.

Após a inserção os blocos puderam ser confeccionados sobre suportes de madeira, a fim de que pudessem ser fixos no micrótomo para o corte das peças, conforme mostra a figura 13.



Figura 13 – Micrótomo (bloco contendo amostra preparado para ser cortado).

Os cortes foram feitos com espessura de 6 μm e depositados em lâminas de vidro lapidado Knitell-Glaser®, visualizados na figura 14.



Figura 14 – Deposição dos cortes histológicos sobre a lâmina.

Após a deposição dos cortes sobre as lâminas, estas foram levadas à estufa a 60°C por cerca de 8 horas para que houvesse a fixação, após a eliminação da parafina. Secas, as lâminas, 15 de cada bloco, foram separadas, marcadas e coradas por hematoxilina-eosina ou tricrômio de Masson. Cada um dos procedimentos pode ser verificado nas tabelas 7 e 8.

Exatamente após a coloração as lâminas foram montadas para análise. Para isso receberam certa quantidade de resina Permount® (resina tolueno + polímero beta-pineno) para que fossem cobertas com lamínula, espalhando a resina de forma a não deixar bolhas entre elas.

As análises das lâminas foram realizadas em microscópio comum modelo Jenaval, Zliss, Alemanha, obedecendo aos seguintes critérios:

- análise da queratina quanto à sua espessura;
- qualidade, volume e número de camadas da epiderme;
- número e profundidade das papilas conjuntivas;
- tecido conjuntivo da derme, grau de inflamação, neovascularização, produção de colágeno e reparação.

Tabela 7 – Metodologia para coloração das lâminas por hematoxilina/eosina (HE).

Etapa	**imersão**	**Tempo**
1	Xilol I	10 min
2	Xilol II	10 min
3	Etanol/xilol 1:1	5 min
4	Etanol absoluto	5 min
5	Etanol 90%	5 min
6	Etanol 70%	5 min
7	Água deionizada	5 min
8	Hematoxilina	46 seg
9	Água corrente	8 min
10	Eosina de Lison	20 seg
11	Água deionizada	Lavagem rápida
12	Etanol 95%	Lavagem rápida
13	Etanol absoluto I	3 min
14	Etanol absoluto II	5 min
15	Etanol/xilol 1:1	5 min
16	Xilol I	5 min
17	Xilol II	5 min

* Metodologia utilizada no laboratório de Histologia da UNESP, Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho.

Tabela 8 – Metodologia para coloração das lâminas por tricrômio de Masson (TM).

Etapa	imersão	Tempo
1	Xilol I	10 min
2	Xilol II	10 min
3	Etanol/xilol 1:1	5 min
4	Etanol absoluto	5 min
5	Etanol 90%	5 min
6	Etanol 70%	5 min
7	Água deionizada	5 min
8	Hematoxilina	46 seg
9	Água corrente	8 min
10	Ácido acético 1%	1 min
11	Solução A	1min 30 seg
12	Água deionizada	Lavagem rápida
13	Ácido acético 1%	1 min
14	Água deionizada	1 min
15	Ácido fosfomolibídico 1%	3 min
16	Solução B	1 min 30 seg
17	Ácido acético 1%	1 min
18	Ácido fosfomolibídico 1%	3 min
19	Água deionizada	Lavagem rápida
20	Etanol 95%	Lavagem rápida
21	Etanol absoluto I	3 min
22	Etanol absoluto II	5 min
23	Etanol/xilol 1:1	5 min
24	Xilol I	5 min
25	Xilol II	5 min

* Metodologia utilizada no laboratório de Histologia da UNESP, Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho.

3.2.5. Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

A OCT é uma técnica óptica que permite a obtenção de imagens tomográficas de cortes transversais em sistemas biológicos, permitindo obter imagens de estruturas teciduais em micro-escala, podendo atingir resoluções de imagem da ordem de 15-20 μm, uma ou duas

ordens de magnitude melhor que o ultra-som clássico. A profundidade de penetração da imagem é determinada pelo coeficiente de absorção e espalhamento óptico.

As análises de OCT foram realizadas em espectrômetro USB2000, Ocean Optics, acoplado a interferômetro de Michelson. O laser utilizado foi de Ti:Safira, com λ= 750 a 857 nm, resolução de 7,3 μm, varredura de 3 mm e passo de 0,01 mm. A montagem do equipamento pode ser vista na figura 15.

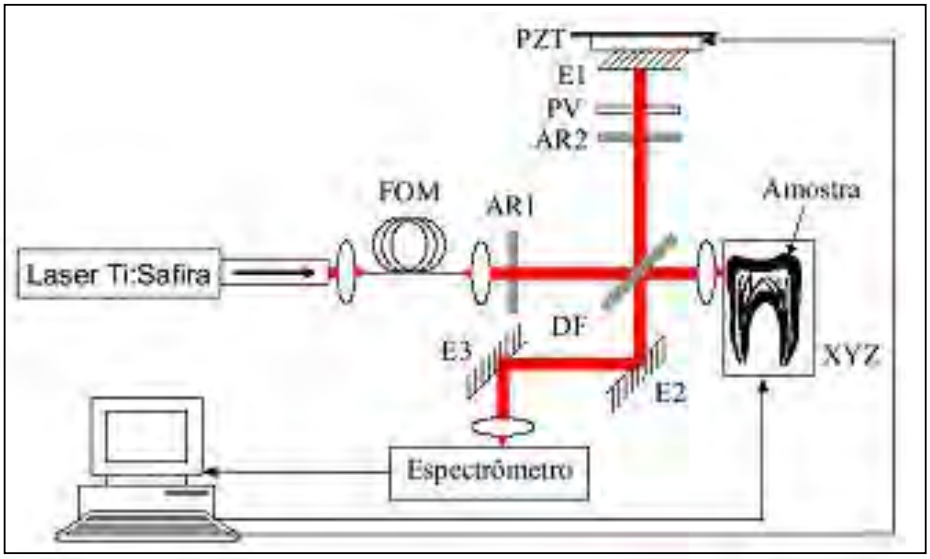


Figura 15 – Montagem esquemática do equipamento utilizado para realização das análises de OCT.

A técnica de OCT foi realizada em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife/PE.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos componentes da amostra comercial

A identificação dos componentes da amostra comercial foi iniciada com a técnica de cromatografia gasosa (Figura 16) onde foi possível visualizar 2 substâncias, analisadas em seguida por espectrometria de massas, mostrando-se ser fenol e ácido salicílico, de acordo com os espectros de massas apresentados nas figuras 17 e 18.

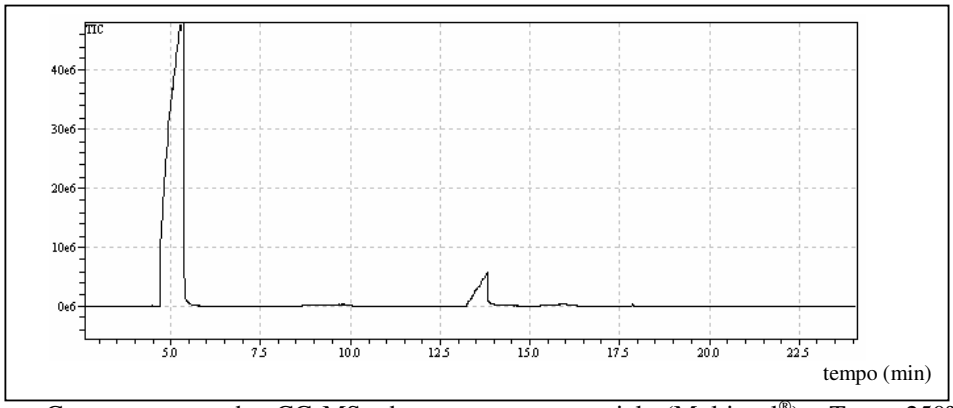


Figura 16 - Cromatograma de CG-MS da amostra comercial (Multipeel®). $T_{injetor}$=250ºC; $T_{detector}$=290ºC; $V_{inj.}$=0,5 µL (split); fluxo = 1,0 mL/min; 40ºC a 250ºC (5ºC/min).

O primeiro pico do cromatograma apresentou tempo de retenção na coluna coincidente ao do padrão de fenol e igual a 5,46 minutos, e o segundo apresentou tempo de retenção na coluna coincidente ao do padrão de ácido salicílico, cujo tempo de retenção foi igual a 13,84 minutos.

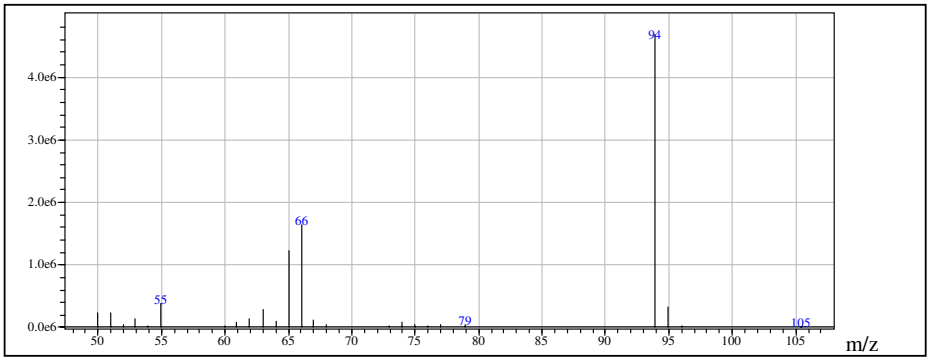
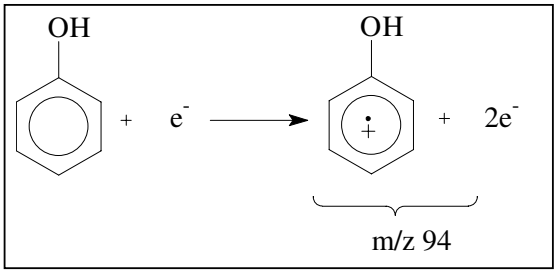


Figura 17 - Espectro de massas referente ao primeiro pico do cromatograma da amostra comercial. IE, 70eV.

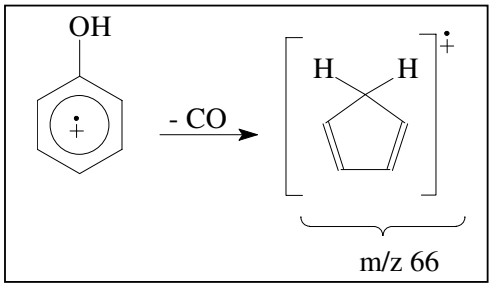
Os esquemas 11 e 12 apresentam a ionização e fragmentação do fenol identificadas através das relações massa/carga de seu espectro.

m/z = 94 – **Pico base**: pico característico do íon molecular, muito intenso devido à presença do anel aromático, estabilizando a carga positiva gerada após o bombardeamento.



Esquema 11 – Ionização da molécula de fenol. Obtenção do íon molecular. (m/z = 94).

m/z = 66 – Perda característica de –CO através de rearranjo intramolecular.



Esquema 12 – Fragmentação do íon molecular de fenol. Rearranjo intramolecular gerando o íon m/z = 66.

Com a análise conjunta do padrão de fragmentação do componente referente ao primeiro pico do cromatograma e sua coincidência com o tempo de retenção do padrão de fenol, pode-se assegurar que o fenol é o primeiro componente da amostra comercial.

Os esquemas 13, 14, 15 e16 apresentam a ionização e fragmentação do ácido salicílico identificadas através das relações massa/carga de seu espectro (Figura 18).

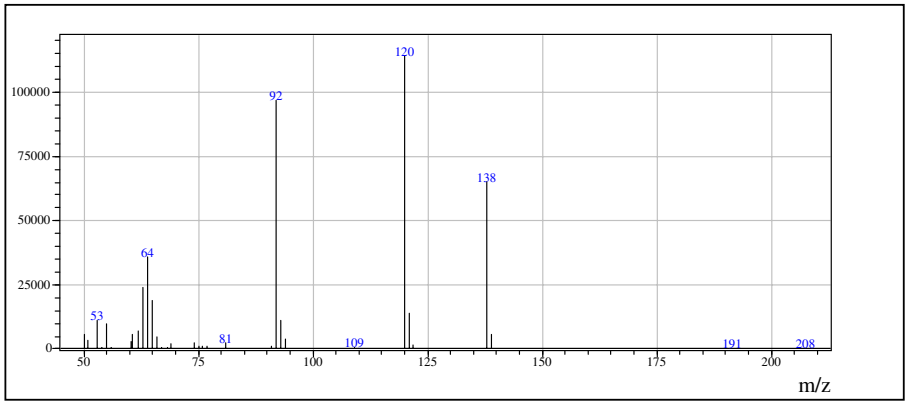
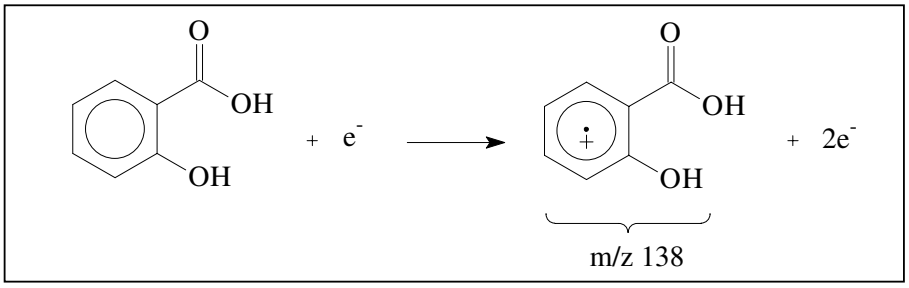


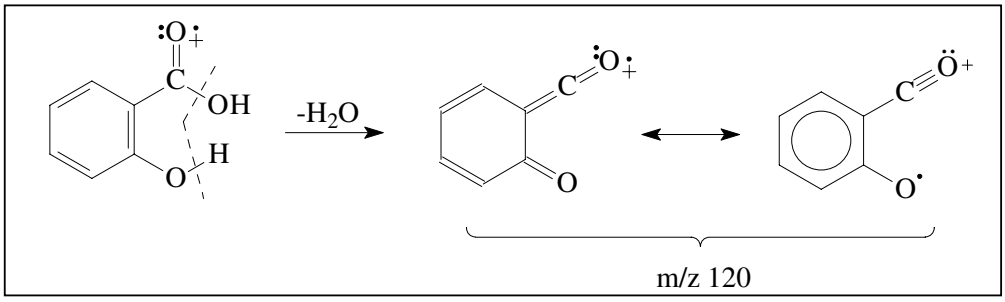
Figura 18 - Espectro de massas referente ao segundo pico do cromatograma da amostra comercial. IE, 70eV.

m/z = 138 – pico característico do íon molecular, relativamente intenso em ácidos carboxílicos aromáticos.



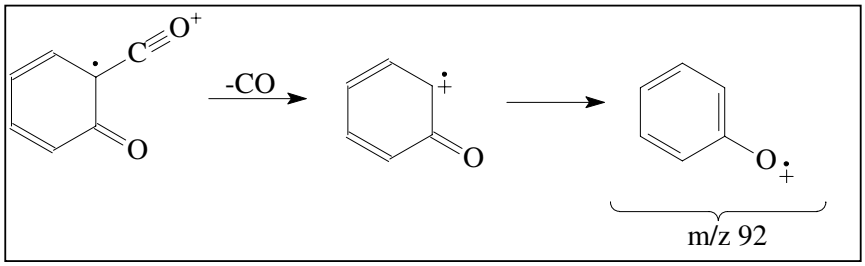
Esquema 13 – Ionização da molécula de ácido salicílico. Obtenção do íon molecular (m/z = 138).

m/z = 120 - **Pico base**: perda característica de água, devido ao efeito orto. Este fenômeno é observado sempre que no anel há um substituinte em orto que contenha um hidrogênio ionizável.



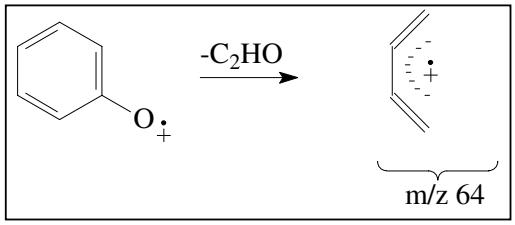
Esquema 14 – Fragmentação do íon molecular de ácido salicílico. Eliminação de água pelo efeito orto e geração do íom m/z = 120.

m/z = 92 – perda de –CO a partir de um fragmento instável previamente formado.



Esquema 15 – Geração do íom m/z = 92 por perda de –CO a partir de um fragmento instável.

m/z = 64 – Perda de $–C_2HO$ a partir do fragmento m/z 92, rompimento do anel.



Esquema 16 – Abertura do anel. Geração do íon m/z = 64.

Com a análise conjunta do padrão de fragmentação do componente referente ao segundo pico do cromatograma e sua coincidência com o tempo de retenção do padrão de ácido salicílico, pode-se assegurar que ácido salicílico é o segundo componente da amostra comercial.

A partir da identificação, comprovou-se a composição da amostra por ressonância magnética nuclear de carbono 13, cujo espectro pode ser visto na figura 19.

No espectro de ressonância podem ser vistos os sinais referentes aos carbonos dos anéis aromáticos na região de δ120,0 ppm; à carboxila do ácido salicílico, com sinal muito fraco, característico de carbonos quaternários, em δ175,2 ppm; aos carbonos oxigenados, na região de δ60,0 a 80,0 ppm e podendo ainda confirmar que a amostra comercial foi preparada em meio de etanol, devido aos sinais vistos em aproximadamente δ21,5 e δ65,0 ppm, referentes à metila e ao carbono carbinólico, respectivamente.

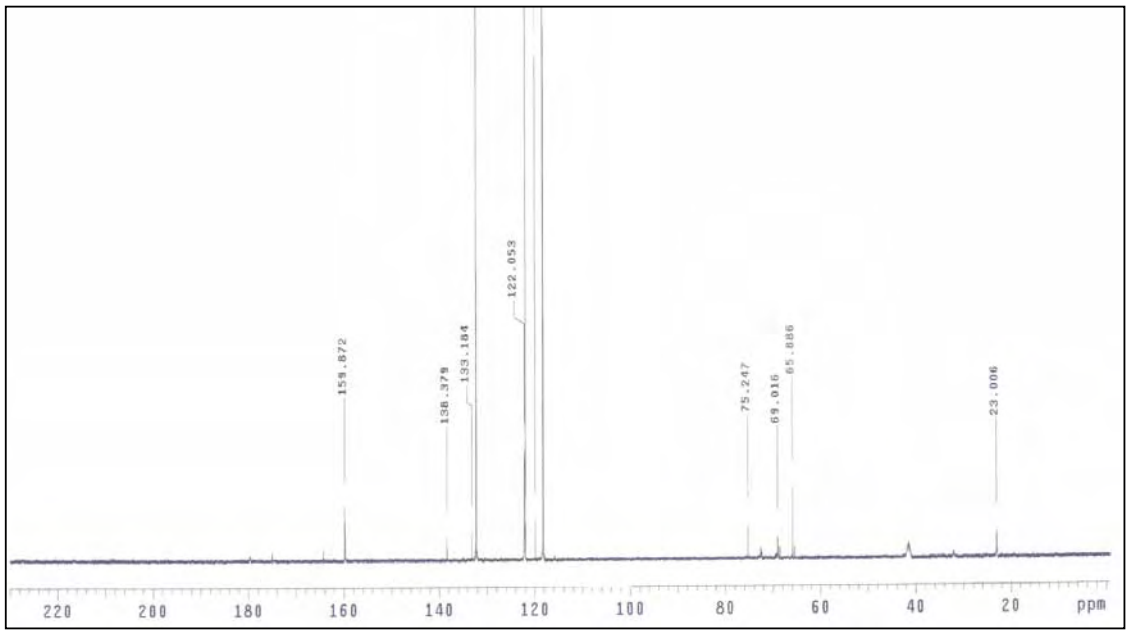


Figura 19 – Espectro de C^{13}-RMN da amostra comercial. Confirmação da composição da amostra.

Os sinais dos componentes da amostra podem ser comparados aos de seus padrões pela tabela 9.

Tabela 9 - Atribuições dos sinais do espectro de ^{13}C-RMN aos carbonos identificados dos componentes, conforme esquema da figura 20.

Carbono	Deslocamento	Padrão
1	159,8	156,9
2	118,2	115,6
3	132,3	129,7
4	121,9	120,6
5	175,2	172,5
6	116,0	112,1
7	164,3	162,6
8	122,0	*
9	138,4	136,3
10	119,9	119,8
11	133,2	131,1

* O carbono correspondente ao Carbono 8 da tabela não foi visualizado no espectro do padrão.

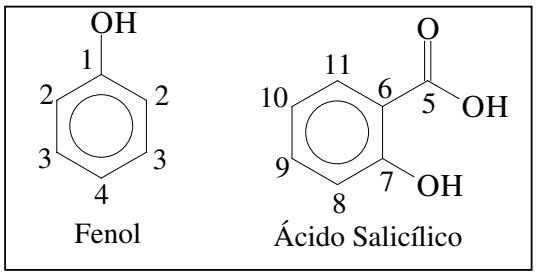


Figura 20 – Identificação dos carbonos nas moléculas de fenol e ácido salicílico para a atribuição dos sinais de C^{13}-RMN.

No espectro ainda aparecem alguns sinais em δ 180,0 ppm e na região de δ 60,0 a 80,0 ppm, além do sinal do carbono carbinólico do etanol, podendo ser atribuídos a possíveis impurezas contidas na amostra. Desta forma, foi possível elucidar a composição da formulação comercialmente utilizada, passando-se então para as análises quantitativas de cada componente.

4.2. Quantificação dos componentes da amostra comercial

A quantificação do fenol foi realizada em triplicata por cromatografia gasosa (CG-FID), após o preparo de cinco soluções a partir do padrão de 88% (em etanol), conforme pode ser verificado na tabela 10 juntamente com os dados da curva analítica obtida.

Tabela 10 - Dados obtidos para a quantificação do fenol por CG-FID.

Volume real (μL)	**A_1**	**A_2**	**A_3**	**$A_{média}$**	**$t_{rmédio}$**
2,6	7319254	7252248	6975502	7182335	5,302
5,3	16759611	16476195	16278045	16504617	5,331
10,6	31595500	31249967	31534773	31460080	5,367
21,1	61697488	60493180	60137974	60776214	5,415
42,2	124752974	115390940	120134209	120092708	5,471
Amostra (25μL)	~~42301730~~	34600673	34542869	34571771	--------

* A = área sob o pico, sendo A_1, A_2 e A_3 pois a análise foi realizada em triplicata.

O valor da média referente às áreas dos picos de fenol nos cromatogramas da primeira análise foi descartado dado sua discrepância com os valores médios de A_2 e A_3, portanto $A_{média}$ para o pico de fenol na amostra comercial foi calculada a partir destas duas áreas. Após a construção da curva analítica, mostrada na figura 21, obteve-se uma reta de

ajuste desta curva. Pela substituição do valor da área referente ao pico de fenol (na amostra comercial) nesta equação foi possível calcular sua porcentagem na amostra comercial.

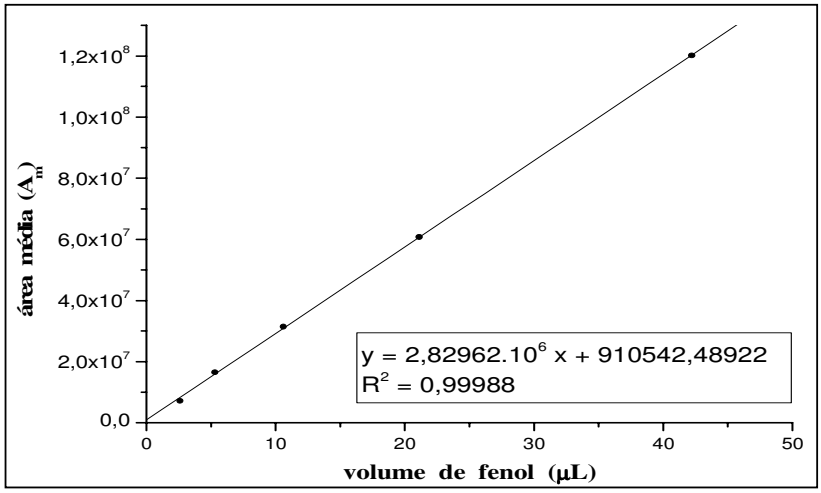


Figura 21 - Curva analítica para quantificação do fenol na amostra comercial.

A análise de fenol na amostra comercial indica porcentagem de fenol nesta formulação igual a 50%.

A quantificação do ácido salicílico não pôde ser realizada também por CG uma vez que esta substância não apresenta um pico simétrico neste cromatograma, ideal e necessário para que a quantificação seja verossímil. Desta forma, optou-se por realizar a quantificação deste componente por HPLC-UV. Deve lembrar que o fenol não poderia ter sido quantificado por esta técnica, uma vez que não há comprimento de onda que viabilize a absorção isolada, fazendo com que o pico do fenol sempre se sobreponha parcialmente ao de ácido salicílico, impossibilitando sua quantificação.

No cromatograma apresentado na figura 22 é possível visualizar dois picos, parcialmente sobrepostos, cujos tempos de retenção são respectivamente iguais a 3,77 minutos, correspondente ao fenol, e 4,23 minutos, correspondente ao ácido salicílico.

Para que fosse possível a quantificação do ácido salicílico realizou-se uma segunda análise da amostra comercial, porém no comprimento de onda λ = 320 nm, no qual ácido

salicílico apresenta absorção máxima e fenol absorção nula, possibilitando a visualização isolada e intensificada do composto a ser quantificado (NATIONAL ISNTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY). O cromatograma da amostra em λ = 320nm é mostrado na figura 23.

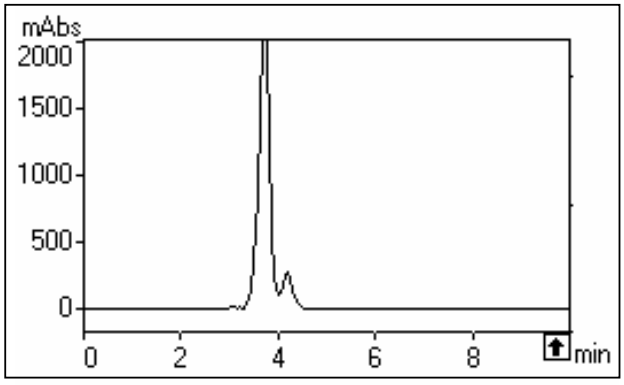


Figura 22 – Cromatograma de HPLC-UV da amostra comercial. λ = 254 nm. MeOH : H_2O: HAc, 8:5,5:1, fluxo = 1,0mL/min.

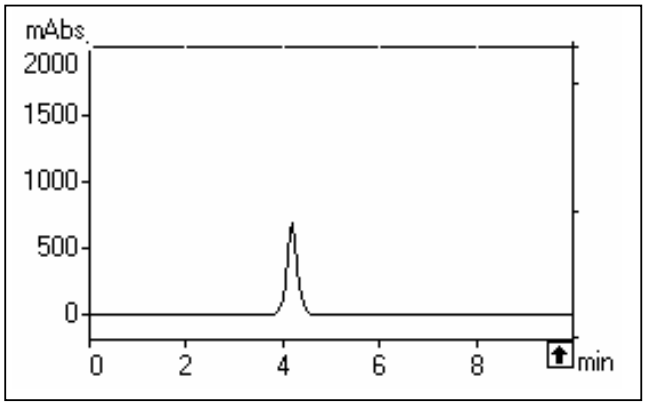


Figura 23 – Cromatograma de HPLC-UV da amostra comercial. λ = 320 nm. MeOH : H_2O: HAc, 8:5,5:1, fluxo = 1,0mL/min.

O tempo de retenção do ácido salicílico nesta análise foi igual a 4,15 minutos. Tendo determinado o comprimento de onda e as condições ideais para a quantificação, foi preparada uma solução de ácido salicílico (AS), a 30% e, a partir daí foram injetados volumes distintos para a obtenção da curva analítica, de acordo coma tabela 11. Para o cálculo da área média referente ao segundo padrão de AS, cujo volume é 1,2 μL, o primeiro valor de área foi

descartado devido à sua discrepância com relação aos outros dois valores para o mesmo volume.

Tabela 11 - Dados obtidos para a quantificação do ácido salicílico por HPLC-UV.

Volume real (μL)	**A_1**	**A_2**	**A_3**	**$A_{média}$**	**$t_{rmédio}$**
0,6	3301931	3257425	3246340	3268565	4,149
1,2	~~8439816~~	6940869	6903345	6922107	4,153
2,4	12321485	12134282	12061029	12172265	4,145
3	17795400	17837491	17422888	17685260	4,140
Amostra (15μL)	11230461	11259595	11239356	11243137	--------

* A = área sob o pico, sendo A_1, A_2 e A_3 pois a análise foi realizada em triplicata.

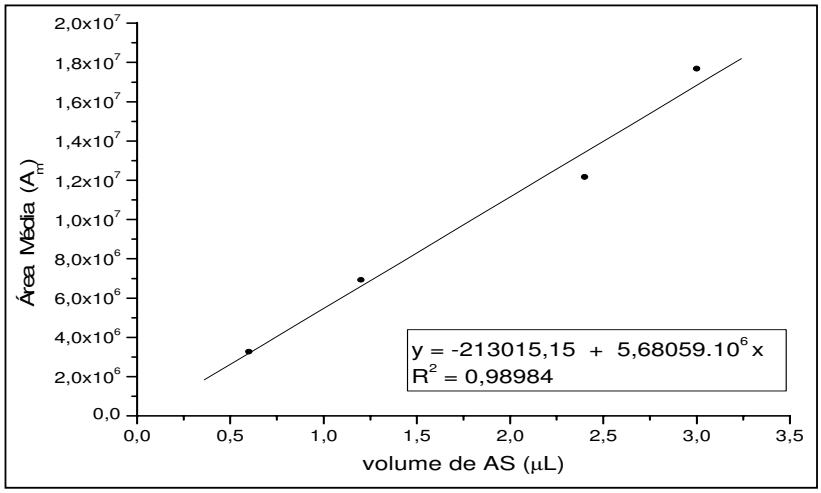


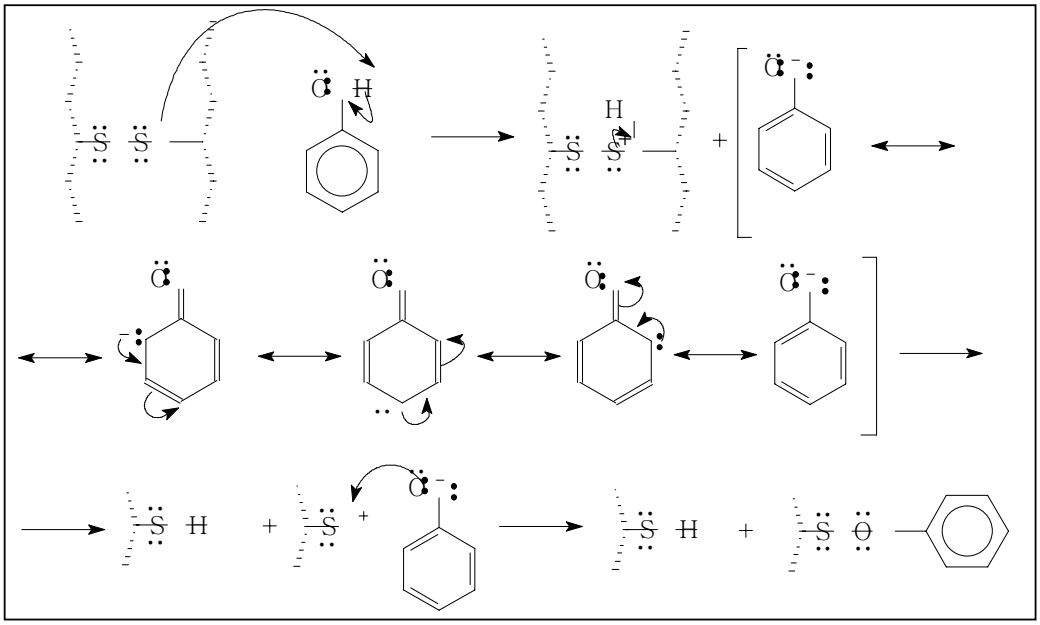
Figura 24 - Curva analítica para quantificação de ácido salicílico na amostra comercial.

Após a construção da curva analítica, mostrada na figura 24, obteve-se uma reta de ajuste desta curva. Pela substituição do valor da área referente ao pico de ácido salicílico (na amostra comercial) nesta equação foi possível calcular sua porcentagem na amostra comercial, sendo igual a 13%.

4.3. Proposição do mecanismo de ação

De acordo com a literatura, o fenol é o agente responsável pelo *peeling*, o que leva à indagação sobre seu mecanismo químico de ação. Uma metodologia de aplicação, bem como um mecanismo de ação foi proposto por Kacowics (2005), sendo aceito pela comunidade

médica, sem ter, no entanto, um embasamento químico coerente. Neste trabalho é proposto um mecanismo quimicamente viável para o rompimento da ponte dissulfeto, principal estrutura de estabilização da queratina, que pode ser visto no esquema 17.



Esquema 17 – Mecanismo proposto para o rompimento da ponte dissulfeto. Reação entre fenol e a proteína queratina.

A proposta apresentada acima representa uma possibilidade de rompimento da ponte dissulfeto que deverá ser ainda confirmada por outras técnicas, por exemplo, espectroscopia Raman por Transformada de Fourier.

4.4. Ensaios biológicos

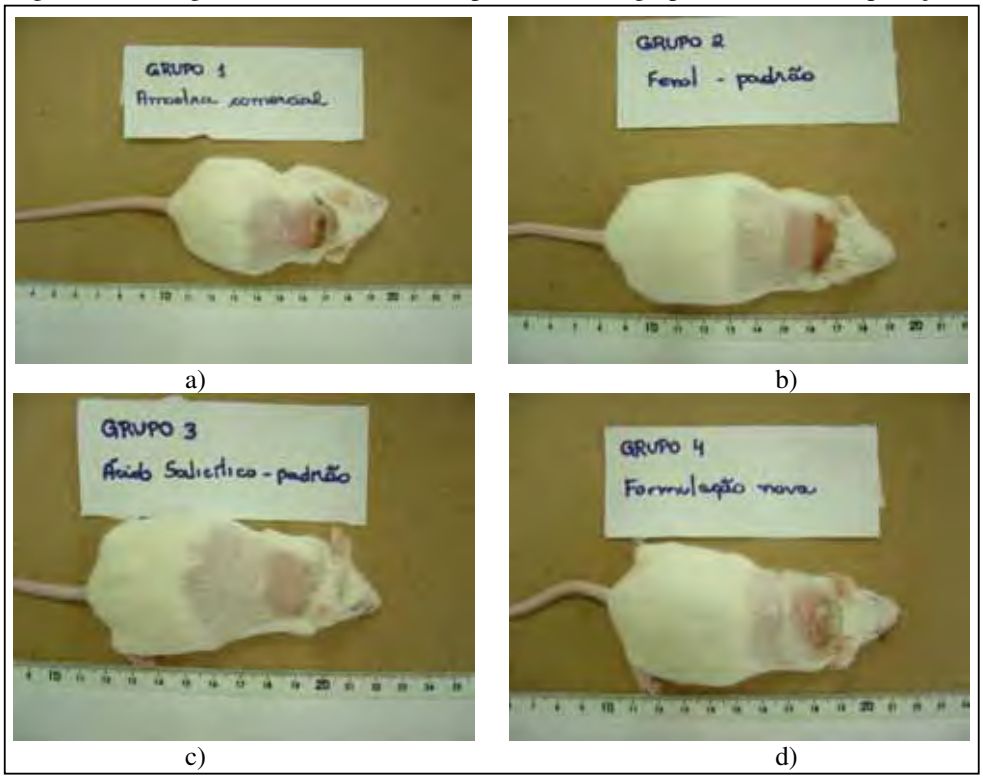
4.4.1. Ensaios preliminares com camundongos

Como já mencionado no item 3.2.1., estes ensaios preliminares visavam à habilidade de manuseio, tratamento, depilação e aplicação das amostras no dorso dos animais. Desta forma, foi feito o acompanhamento visual das etapas do tratamento, podendo ser feita a

comparação entre o controle, ou seja, o grupo que não recebeu aplicação alguma, e os grupos experimentais, após três e sete dias, como mostrado nas figuras 25 a 27.



Figura 25 – Fotografia do dorso do animal pertencente ao grupo controle (sem aplicação).



a) b) c) d)

Figura 26 – Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes aos quatro grupos experimentais, no terceiro dia após as aplicações. a) Grupo 1 - Amostra comercial, b) Grupo 2 – Padrão de fenol a 88% (em etanol), c) Grupo 3 - Padrão de ácido salicílico e, d) Grupo 4 - Nova formulação A.

Pela análise das fotografias, é possível visualizar que ao terceiro dia os animais do grupo 1 (amostra comercial) apresentavam eritema acentuado, com necrose do tecido epitelial. Os animais do grupo 2 (padrão de fenol) apresentavam eritema acentuado e somente

início de necrose. Os animais do grupo 3 (padrão de ácido salicílico) não apresentavam eritema e somente uma leve descamação. Já os animais do grupo 4 (nova formulação A, item 3.2.1.) apresentavam eritema razoável e necrose com descamação da pele do dorso. Ao terceiro dia dois animais, ambos do grupo 4, morreram.

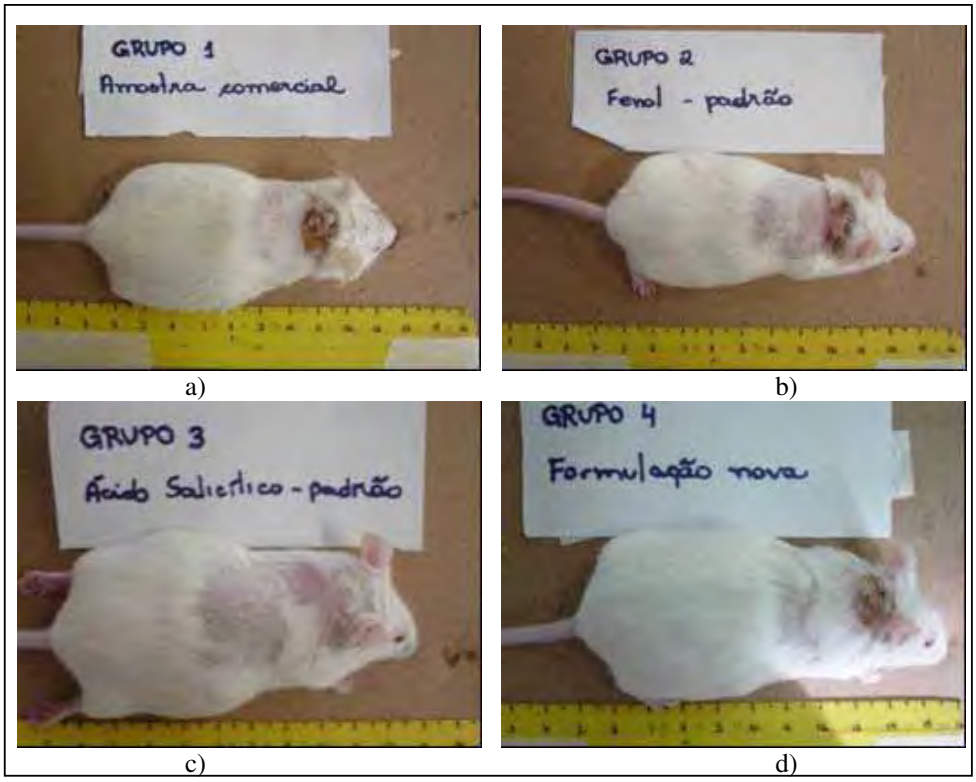


Figura 27 – Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes aos quatro grupos experimentais, no sétimo dia após as aplicações. a) Grupo 1 – Amostra comercial, b) Grupo 2 - Padrão de fenol a 88% (em etanol), c) Grupo 3 - Padrão de ácido salicílico a 30% (em etanol) e, d) Grupo 4 – nova formulação A.

Ao sétimo dia os animais do grupo 1 apresentavam eritema acentuado, com necrose profunda do tecido epitelial. Os animais do grupo 2 apresentavam eritema acentuado com necrose profunda do tecido epitelial, assemelhando-se bastante aos animais do grupo 1. Os animais do grupo 3 não apresentavam eritema e somente vestígios de uma leve descamação. Os animais do grupo 4 não apresentavam eritema, apresentando necrose profunda com descamação da pele do dorso. Com estes ensaios preliminares foi possível excluir a proposta

de nova formulação A, uma vez que os resultados não mostraram ação satisfatória e condizente com os objetivos propostos para uma nova formulação.

4.4.2. Ensaios toxicológicos

Para que fosse possível determinar a ocorrência ou não de intoxicação cardíaca, hepática e renal, pelo agente de *peeling*, foram realizados ensaios biológicos com coelhos. Os animais foram divididos em quatro grupos de 5 animais cada. Antes de se dar início às aplicações de amostra comercial, padrão de fenol a 50%, padrão de ácido salicílico a 13% e proposta de nova formulação B (item 3.2.2.), respectivamente nos grupos 1, 2, 3 e 4, tomou-se aleatoriamente 5 dos 20 animais envolvidos no estudo para que fosse coletado sangue do grupo controle. Posteriormente, os animais foram divididos entre os quatro grupos mencionados e deu-se início às aplicações.

Após a aplicação, no chamado DIA 0, foram coletadas amostras de sangue de todos os animais nos DIAS 3, 6 e 12 que se seguiram. Imediatamente após a coleta do sangue, iniciou-se o processo de separação do soro por coagulação natural seguida por centrifugação. Todo o processo de amostragem foi realizado cuidadosamente para que não houvesse hemólise das hemácias, interferindo assim na análise e determinação das atividades das enzimas a serem determinadas (MORI, 2002).

Os marcadores de toxicidade analisados foram creatina quinase (CK) para determinar cardiotoxicidade, transaminase aspártica (AST) e alanina aminotransferase (ALT) para determinar cardio e hepatotoxicidade, alanina aminotransferase (ALT) para determinar hepatotoxicidade e uréia e creatinina, para determinar nefrotoxicidade.

O procedimento desde o primeiro dia (DIA 0) foi acompanhado, fazendo-se registros fotográficos das condições das regiões cutâneas dos coelhos submetidas às aplicações. O acompanhamento foi feito até o 12º dia e as fotos são mostradas nas figuras 28 a 32.



Figura 28 – Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes ao grupo controle (sem aplicação, animais apenas com o dorso depilado).



Figura 29 - Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes ao grupo 1 (amostra comercial), acompanhamento do procedimento. a) DIA 0 (imediatamente após a aplicação), b) DIA 3, c) DIA 6, d) DIA 12 e, e) DIA 40.

Nas fotografias apresentadas na figura 29, referentes ao grupo 1 (AC – amostra comercial) pode-se visualizar o acompanhamento das fases do tratamento após a aplicação da amostra comercial no dorso dos animais. Na figura 29a, imediatamente após a aplicação nota-se mudança na coloração da região aplicada, mas não é possível visualizar o *frosting* da pele devido à presença de grande quantidade de pêlos (a depilação foi feita à máquina bem rente, mas não permite retirar os pêlos até as raízes).

Na figura 29b, ao terceiro dia após o tratamento, há formação de uma camada espessa, como uma crosta. Ao sexto dia após o tratamento (figura 29c) esta crosta se torna menos compacta e inicia-se o processo de descamação, que ao décimo segundo dia após o tratamento (figura 29d) está completo. Neste estágio a pele do animal se apresenta totalmente sem pêlos, com eritema e regiões mais profundamente atingidas, apresentando feridas.

Ao quadragésimo dia (figura 29e) a região está totalmente recuperada e o crescimento dos pêlos se deu de forma uniforme e completa.

Nas fotografias apresentadas na figura 30, referentes ao grupo 2 (FE – fenol) pode-se visualizar o acompanhamento das fases do tratamento após a aplicação do padrão de fenol, a 50% em etanol, no dorso dos animais.

Na figura 30a, imediatamente após a aplicação não é possível notar mudanças imediatas na pele, ou na região aplicada. Na figura 30b, ao terceiro dia após o tratamento, há formação de uma camada espessa, bem delineada. Ao sexto dia após o tratamento (figura 30c) esta camada se rompe em alguns pontos, causando a descamação e o aparecimento de feridas com eritema. Ao décimo segundo dia após o tratamento (figura 30d) é possível notar que houve descamação quase total desta crosta, restando ainda alguns pontos cobertos por pele.

Nas regiões peladas, a pele do animal apresenta eritema e apenas dois pontos atingidos mais profundamente, com feridas.

Ao quadragésimo dia (figura 30e) a região está totalmente recuperada e o crescimento dos pêlos se deu de forma uniforme, apesar de ainda não ter atingido seu comprimento total.

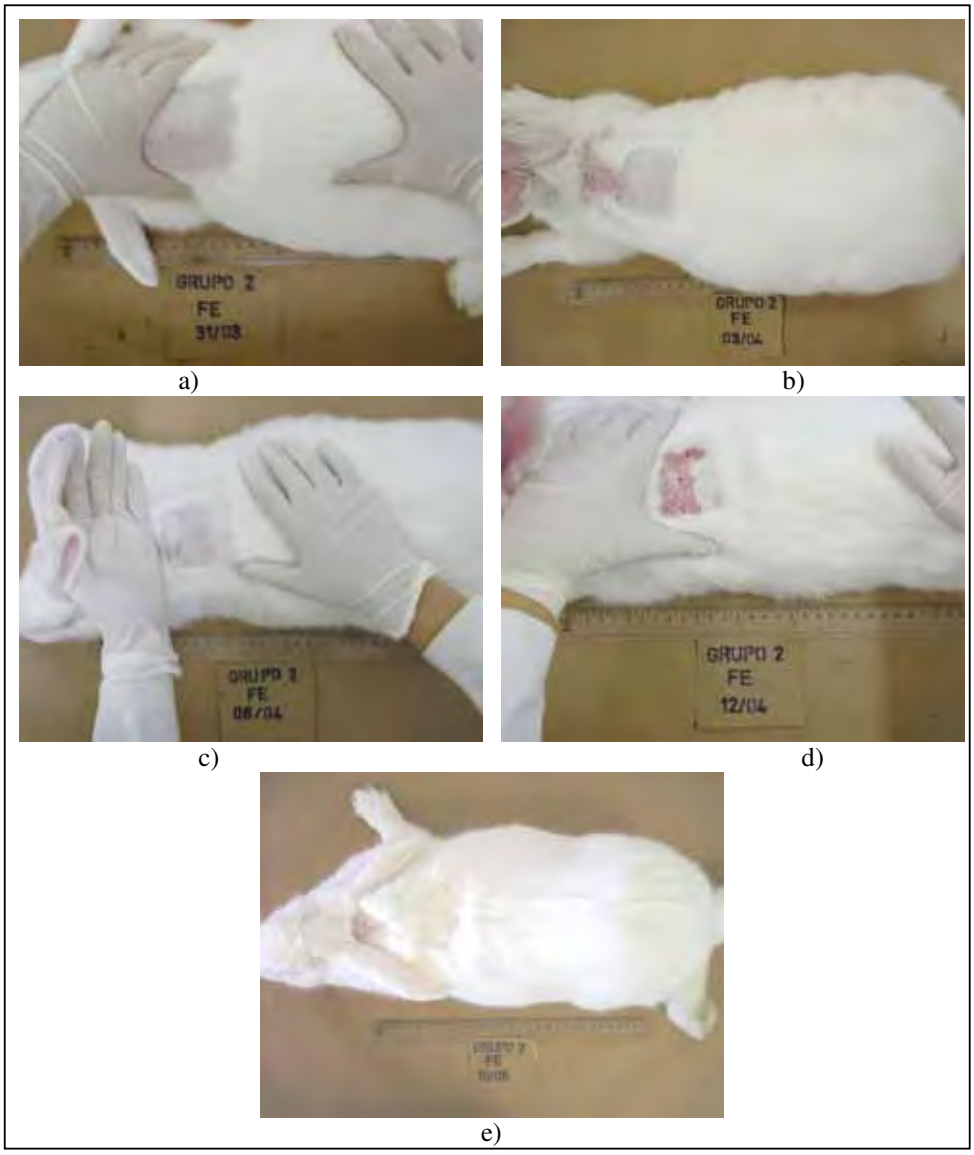


Figura 30 – Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes grupo 2 (fenol), acompanhamento do procedimento. a) DIA 0 (imediatamente após a aplicação), b) DIA 3, c) DIA 6, d) DIA 12, e) DIA 40.

Nas fotografias apresentadas na figura 31, referentes ao grupo 3 (AS – ácido salicílico) pode-se visualizar o acompanhamento das fases do tratamento após a aplicação do padrão de ácido salicílico, a 13% em etanol, no dorso dos animais.

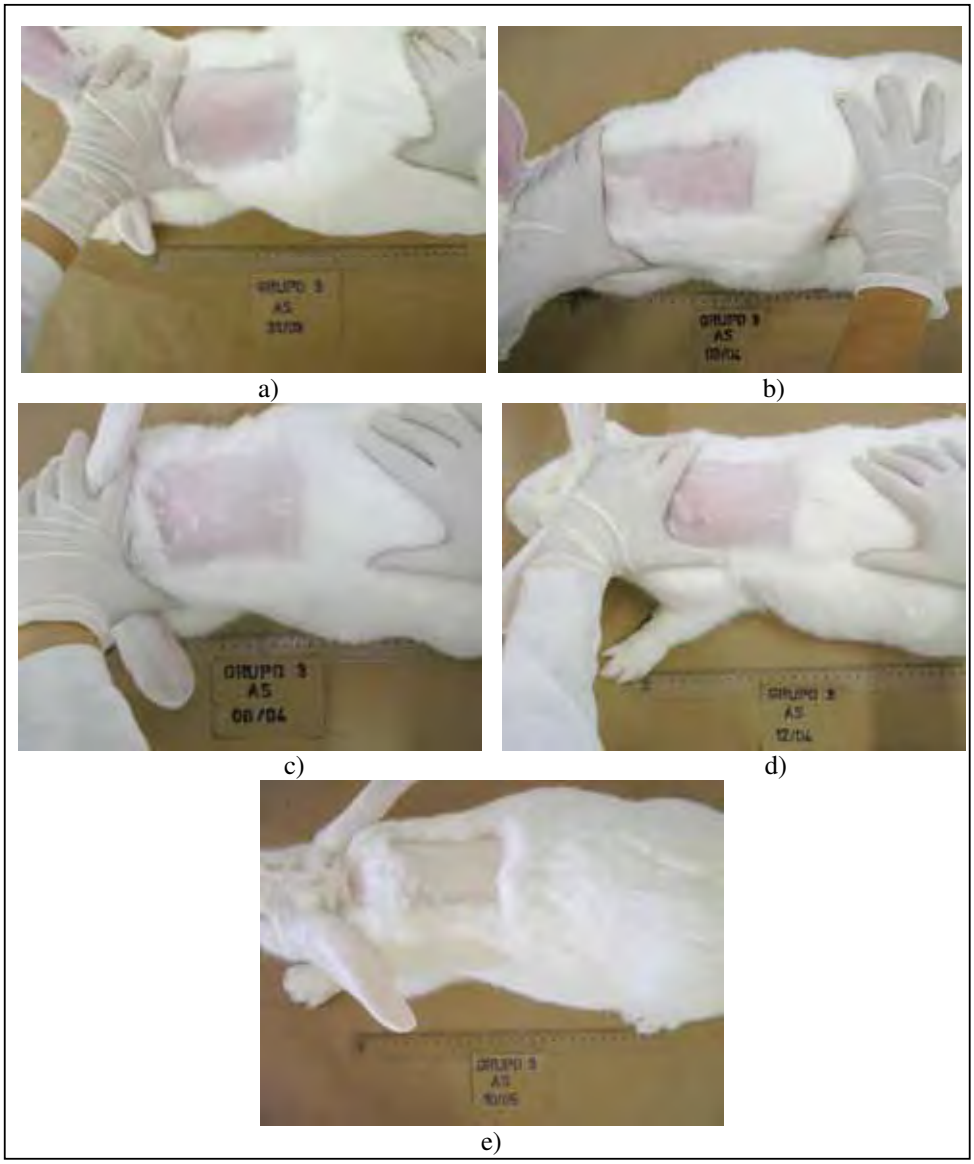


Figura 31 - Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes ao grupo 3 (ácido salicílico), acompanhamento do procedimento. a) DIA 0 (imediatamente após a aplicação) e, b) DIA 3, c) DIA 6, d) DIA 12 e, e) DIA 40.

Durante todo o processo não é possível notar nenhuma alteração. Não há aparecimento de eritema, edema ou descamação. No entanto, ao quadragésimo dia (figura 31e) a região submetida à aplicação não recuperou a pelagem original, permanecendo com os pêlos curtos inclusive nas regiões circunvizinhas.

Nas fotografias apresentadas na figura 32, referentes ao grupo 4 (NF –nova formulação B) pode-se visualizar o acompanhamento das fases do tratamento após a aplicação da terceira proposta de nova formulação no dorso dos animais.



Figura 32 – Fotografias dos dorsos dos animais pertencentes grupo 4 (NF - proposta de nova formulação), acompanhamento do procedimento. a) DIA 0 (imediatamente após a aplicação), b) DIA 3, c) DIA 6, d) DIA 12 e, e) DIA 40.

Na figura 32a, imediatamente após a aplicação, nota-se o aparecimento imediato de eritema. Na figura 32b, ao terceiro dia após o início do tratamento, há formação de uma camada espessa, com eritema ao redor. Ao sexto dia após o tratamento (figura 32c) esta

camada está iniciando o processo de descamação causando o aparecimento de uma ferida. Ao décimo segundo dia após o tratamento (figura 32d) inicia-se o descolamento desta crosta, mas ainda bem aderida à pele do animal.

Ao quadragésimo dia (figura 32e) a região está quase totalmente recuperada e o crescimento dos pêlos se deu de forma uniforme, apesar de ainda não ter atingido seu comprimento total, nas bordas da região depilada.

4.4.2.1. Aspartato Aminotransferase - AST

Os resultados destes ensaios estão apresentados na tabela 12. Os resultados da tabela foram colocados em gráficos para facilitar a visualização da alteração da atividade enzimática, conforme pode ser visto na figura 33.

Tabela 12 - Atividades enzimáticas da Aspartato Aminotransferase em soro sangüíneo dos coelhos.

AST	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 12
controle	27,8	---	---	---
AC	---	44,4	35,6	27,6
FE	---	37,6	29,2	21,6
AS	---	38,0	32,6	28,0
NF B	---	29,8	31,8	25,4

* AC: amostra comercial, FE: padrão de fenol, AS: padrão de ácido salicílico, NF: proposta de nova formulação.

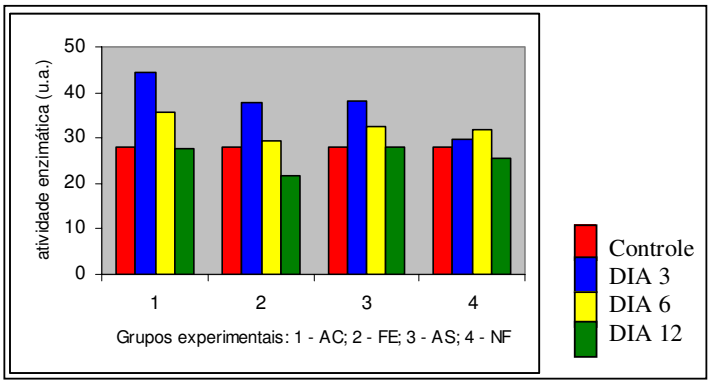


Figura 33 – Histograma representativo da variação da atividade enzimática de AST em soro de coelhos. Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais.

No DIA 3 todos os grupos apresentaram aumento na atividade sérica de AST, sendo o mais intenso o aumento do grupo 1, com 59,71% de aumento com relação ao grupo controle, seguido dos grupos 3 e 2, com um aumentos de 36,69% e 32,25%, respectivamente, em relação ao grupo controle. O grupo 4 (Nova formulação B) apresentou aumento de apenas 7,19% com relação ao controle. Já no DIA 6 pôde-se notar uma queda bastante acentuada dos três primeiros grupos com relação ao período anterior, mas um aumento do valor do grupo 4 (14,39% com relação ao controle).

No DIA 12, todos os grupos apresentaram decréscimo com relação ao período anterior, mantendo-se abaixo inclusive do grupo controle, com exceção do grupo 3, permanecendo com a atividade sérica de AST 0,72% acima da atividade do grupo controle.

O aumento da atividade enzimático de AST, como já dito anteriormente, indica dano hepático ou lesões cardíacas. No entanto, há trabalhos (FERREIRA et al., 2006) considerando que há degeneração leve das células hepáticas quando atividade enzimática se apresenta até 20 vezes maior que o valor do grupo controle, degeneração moderada, quando de 150 a 200 vezes maior e, degeneração severa, quando acima de 1000 vezes maior que os valores de atividade enzimática do grupo controle. Outros (BRANDÃO et al., 2000) consideraram, baseados em estudos histológicos de cortes de seções do fígado dos coelhos e determinações enzimáticas, que tendo um aumento de 62 vezes na atividade enzimática de AST é indicado o desenvolvimento de cirrose.

De qualquer forma o aumento mais significativo neste tipo de ensaio foi de quase 60%, não atingindo nem o dobro do valor do grupo controle e sendo, portanto, um forte indicativo de que não houve intoxicação hepática.

4.4.2.2. Alanina Aminotransferase - ALT

Os resultados destes ensaios estão apresentados na tabela 13. A figura 34 mostra os resultados na forma de gráfico.

Tabela 13 - Atividades enzimáticas da Alanina Aminotrasferase em soro sangüíneo de coelhos.

ALT	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 12
Controle	89,8	---	---	---
AC	---	90,4	99,6	96,2
FE	---	55,2	65,2	61,0
AS	---	101,2	98,4	92,2
NF B	---	75,0	82,0	65,8

* AC: amostra comercial, FE: padrão de fenol, AS: padrão de ácido salicílico, NF: proposta de nova formulação

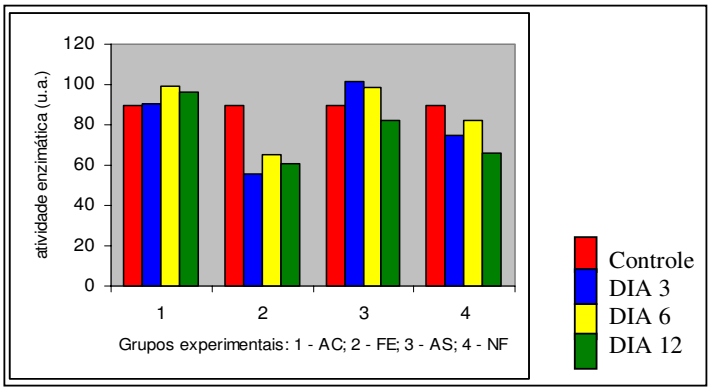


Figura 34 – Histograma representativo da variação da atividade enzimática de ALT em soro de coelhos. Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais.

No DIA 3 apenas os grupos 1 e 3 apresentaram aumento na atividade sérica de ALT, mas, mesmo assim, muito baixas: 0,67 e 12,69%, respectivamente, com relação ao grupo controle. Tanto o grupo 2 quanto o 4 apresentaram um decréscimo na atividade com relação ao grupo controle, sendo 38,53 e 16,48%, respectivamente.

No DIA 6 pôde-se notar um aumento na maioria deles com relação ao período anterior, com exceção do grupo 3. Mesmo assim, os valores da atividade enzimática para os grupos 2 e 4 ainda permaneceram abaixo do valor do grupo controle.

No DIA 12, todos os grupos apresentaram decréscimo com relação ao período anterior, mantendo-se, os grupos 2 e 4 abaixo, ainda, do grupo controle. Os grupos 1 e 3

apresentaram valores acima do grupo controle porém dentro de uma faixa de 10% com relação a este grupo: 7,13 e 2,67%, respectivamente.

O aumento da atividade enzimático de ALT,assim como de AST, como já dito anteriormente, indica dano hepático, sendo esta enzima mais específica para tal finalidade. Da mesma forma que a AST, há trabalhos (FERREIRA et al., 2006) considerando que há degeneração leve das células hepáticas quando atividade enzimática se apresenta até 20 vezes maior que o valor do grupo controle, moderada, quando de 150 a 200 vezes maior e, severa, quando acima de 1000 vezes maior que os valores de atividade enzimática do grupo controle.

Da mesma forma que para a determinação de AST, Brandão e colaboradores (2000) indicam que um aumento de 23 vezes no valor da atividade enzimática de ALT representa o desenvolvimento de cirrose. De qualquer forma o aumento mais significativo neste tipo de ensaio foi de 12,69%, sendo, portanto, um forte indicativo de que não houve intoxicação hepática.

Corroborando estes resultados, pôde-se analisar ainda os valores das atividades séricas das transaminases de acordo com seu aumento em unidades/dia. Segundo Wallach (1976) as transaminases devem variar menos de 10 unidades/dia por indivíduo. Acima de 10 unidades/dia seus valores seriam considerados aumentados e conseqüentemente seriam indícios de hepatopatias ou distúrbios cardíacos. Este comportamento não foi observado para nenhum grupo experimental tanto para AST quanto para ALT, sendo um indício de que não houve intoxicação dos animais pelas formulações aplicadas em seu dorso.

4.4.2.3. Creatina Quinase - CK

Os resultados destes ensaios estão apresentados na tabela 14. Os resultados da tabela foram colocados em gráficos para facilitar a visualização da alteração das concentrações, conforme pode ser visto na figura 35.

Tabela 14 - Atividades enzimáticas da creatina quinase em soro sangüíneo de coelhos.

CK	DIA 0	DIA 3	DIA 12
controle	763,06	---	---
AC	---	830,30	661,52
FE	---	1042,92	513,60
AS	---	901,60	552,76
NF B	---	558,50	361,98

* AC: amostra comercial, FE: padrão de fenol, AS: padrão de ácido salicílico, NF: proposta de nova formulação.

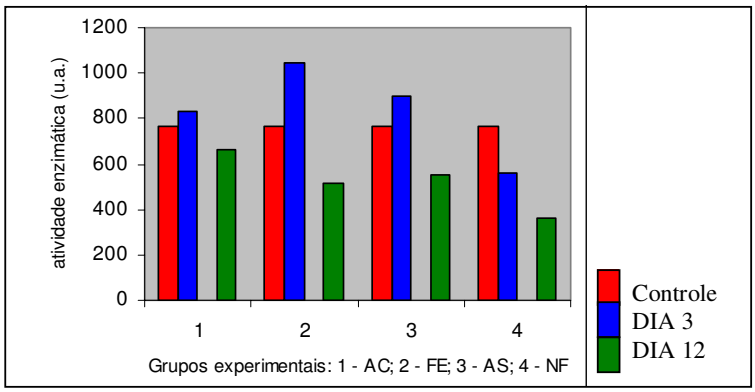


Figura 35 – Histograma representativo da variação da atividade enzimática de CK em soro de coelhos. Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais.

Nota-se que no DIA 3, ou seja, três dias após a aplicação, tanto a amostra comercial, quanto os padrões de fenol e ácido salicílico promoveram um aumento na atividade da enzima, sendo o do padrão de fenol o mais intenso, com 36,68%. Para a amostra comercial o aumento não chegou a 10% (8,81%), não sendo, portanto, um aumento considerável, mas para os padrões, o aumento (acima de 10%) indica possíveis danos ao tecido cardíaco. Já a proposta de nova formulação B promoveu uma diminuição de 26,81% da atividade da CK.

O período referente ao DIA 6 foi excluído das análises e discussão dos resultados devido a alterações nos seus valores provocadas por erros nos procedimentos laboratoriais.

No DIA 12, no entanto, nota-se que para todas as aplicações houve um decréscimo intenso na atividade sérica de CK, sendo o mais intenso para a proposta de nova formulação B (52,56%), seguido pelo padrão de fenol (32,69%), padrão de ácido salicílico (27,56%) e amostra comercial (13,31%).

De acordo com Sacher e Mc Pherson (1991), a atividade enzimática de CK pode variar consideravelmente dependendo da quantidade, freqüência e intensidade de exercícios físicos praticados por cada indivíduo. Indivíduos sedentários podem apresentar níveis de CK de 30-50U/L. Em indivíduos com atividade física intensa, estes níveis variam de 500-1000U/L, podendo atingir até 2000U/L. Desta maneira, o estabelecimento de níveis normais de variabilidade torna-se complexo, o que faz com que a análise seja feita de acordo com o aumento em vezes.

Uma elevação média a moderada, considerada de duas a 4 vezes maior que o valor inicial pode indicar, entre outros fatores, trauma ou até mesmo infarto do miocárdio. Um aumento de cinco vezes ou mais, considerado severo, indica infarto do miocárdio e outras disfunções. Sua diminuição não tem significado clínico e, desta forma, de acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que nenhuma das formulações aplicadas apresentou efeito cardiotóxico.

4.4.2.4. Uréia

Os resultados destes ensaios estão apresentados na tabela 15. A figura 36 é representativa dos resultados destes ensaios.

Tabela 15 – Concentração de uréia em soro sangüíneo de coelhos.

Uréia	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 12
controle	41,5	---	---	---
AC	---	42,6	48,8	42,0
FE	---	52,6	47,4	43,6
AS	---	42,4	54,4	48,2
NF B	---	46,2	51,6	42,6

* AC: amostra comercial, FE: padrão de fenol, AS: padrão de ácido salicílico, NF: proposta de nova formulação.

Nota-se que no DIA 3, ou seja, três dias após a aplicação, todas as aplicações promoveram um aumento na concentração de uréia no soro sangüíneo, sendo o do padrão de fenol novamente o mais intenso, com 26,75%.

Para a amostra comercial e padrão de ácido salicílico o aumento não chegou a 10% (2,65 e 2,17%, respectivamente), não sendo, portanto, um aumento significativo. A proposta de nova formulação, assim como o fenol, também promoveu o aumento na concentração de uréia no soro, sendo este de 11,33%.

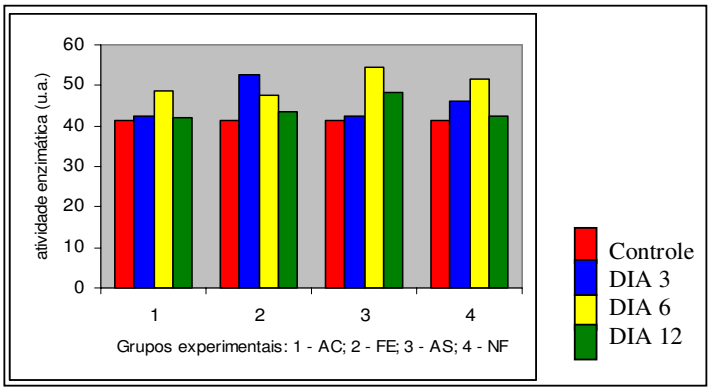


Figura 36 – Histograma representativo da variação da concentração de uréia em soro de coelhos. Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais.

Já no DIA 6, é possível notar que os valores aumentaram para todas as aplicações com exceção do fenol, que teve queda com relação ao DIA 3.

No DIA 12, observa-se diminuição para todos os grupos, comparando com o DIA 6, mas ainda permanecendo todos os valores acima do valor do grupo controle. No entanto, só o grupo de aplicação do padrão do ácido salicílico permaneceu com este valor acima de 10% (16,14%) comparado com o grupo controle.

Analisando os resultados acima, pode-se notar que o fenol teve maior impacto inicial, sendo amenizado nos dias seguintes e a amostra comercial foi a que apresentou menor valor máximo da concentração de uréia durante o procedimento.

O aumento na concentração de uréia, porém, não é conclusivo a respeito da toxicidade renal, uma vez que esta é produzida no fígado e apenas eliminada via renal. Desta forma pode-se afirmar que se houvesse dano hepático, o nível sérico de uréia seria reduzido, uma vez que esta não seria mais produzida (função hepática), mas continuaria a ser eliminada (via renal). Se houvesse dano renal, seu nível sérico se elevaria, visto que a produção continuaria

normalmente, mas sua eliminação seria prejudicada. No entanto se o dano atingisse os dois órgãos em questão, então provavelmente o valor nível sérico de uréia seria expresso em termos da soma dos efeitos e parcialmente cancelado, apresentando alteração não conclusiva a respeito da intoxicação dos órgãos envolvidos.

Desta forma, mesmo após a observação do aumento de seu nível, não se pode afirmar que esta alteração é absoluta, não havendo contribuição negativa por possíveis danos hepáticos, sendo necessária a análise conjunta com os valores obtidos para creatinina.

4.4.2.5. Creatinina

Os resultados destes ensaios estão apresentados na tabela 16. Os resultados da tabela foram colocados em gráficos para facilitar a visualização da alteração das concentrações, conforme pode ser visto na figura 37.

Tabela 16 - Concentração de creatinina em soro sangüíneo de coelhos.

Creatinina	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 12
controle	0,90	---	---	---
AC	---	0,98	1,03	1,01
FE	---	1,20	1,07	1,01
AS	---	1,10	1,18	1,10
NF B	---	1,17	1,17	1,10

* AC: amostra comercial, FE: padrão de fenol, AS: padrão de ácido salicílico, NF: proposta de nova formulação

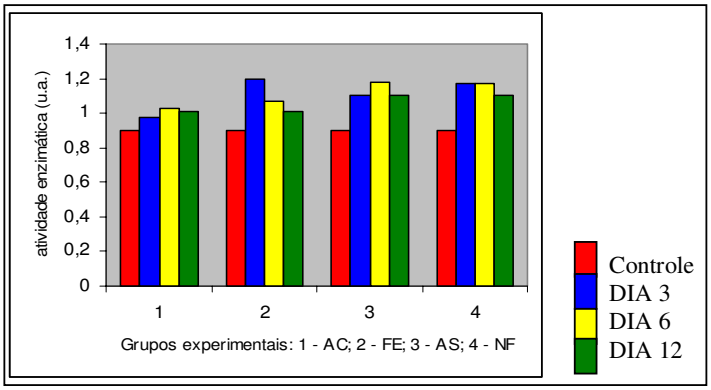


Figura 37 – Histograma representativo da variação da concentração de creatinina em soro de coelhos. Função do tempo após a aplicação. Comparação do controle com cada um dos grupos experimentais.

No DIA 3 todos os grupos apresentaram aumento na concentração de creatinina, sendo novamente o mais intenso o aumento do grupo 2 (padrão de fenol), de 33,33%, seguido do grupo 4 (proposta de nova formulação), com um aumento de 30,00% em relação ao grupo controle. Mais uma vez o aumento no grupo 1 (amostra comercial) ficou abaixo dos 10%, com 8,89% e o grupo 3 (padrão de ácido salicílico) apresentou aumento de 22,22%.

Já no DIA 6 pôde-se notar que os grupos 1 e 3 tiveram a concentração sérica de creatinina aumentada com relação ao dia 3, o grupo 4 manteve a mesma concentração do DIA 3 e somente o grupo 2 apresentou decréscimo com relação ao DIA 3, mantendo-se, porém, acima de 10% (18,89%) em relação ao grupo controle.

No DIA 12, todos os grupos apresentaram decréscimo com relação ao período anterior, mantendo-se mais altos os níveis de creatinina nos grupos 3 e 4, mas todos ainda se mantendo acima de 10% em relação ao grupo controle.

O aumento da concentração sérica de creatinina, como já dito anteriormente, indicaria possível dano renal, uma vez que os rins são responsáveis pela sua eliminação. Não há parâmetros determinados para coelhos, no entanto, a quantidade de creatinina gerada por um indivíduo é proporcional à sua massa muscular esquelética. Desta maneira extrapolando os parâmetros para humanos, adultos, do sexo masculino, os valores normais estão entre 0,6 a 1,3 mg/dL (SACHER e Mc PHERSON, 1991). Para todos os grupos experimentais e grupo controle, os valores permaneceram dentro desta faixa prevista indicando que não houve intoxicação renal por ação das formulações aplicadas nos dorsos dos animais.

Segundo Wallach (1976), a creatinina no soro é um indicador mais específico e mais sensível da função renal que a uréia no sangue. Contudo, a determinação simultânea de ambos os metabólitos é capaz de fornecer informação mais completa a respeito da toxicidade tanto hepática quanto renal.

Analisando-se a razão uréia/creatinina é possível inferir sobre a ocorrência de alguma disfunção renal ou hepática. A tabela 17 mostra os valores desta razão para todos os grupos experimentais, em todos os períodos de análise.

Observando que os valores da razão uréia/creatinina para todos os grupos foi muito acima de 10:1, poder-se-ia inferir que estaria ocorrendo mau funcionamento dos rins e que o principal responsável por esta disfunção seria o excessivo catabolismo tissular.

Tabela 17 – Razão uréia/creatinina para os grupos experimentais em todos os períodos de análise.

Uréia/creat.	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 12
controle	46,11	---	---	---
AC	---	43,5	47,4	41,6
FE	---	43,8	44,3	43,2
AS	---	38,5	46,1	43,8
NF B	---	39,5	44,1	38,7

No entanto, observa-se que também o grupo controle, cujos animais não receberam aplicação de formulação alguma, também apresenta este valor na mesma ordem de grandeza. Desta forma, leva-se a crer que as alterações não sejam significativas, sendo mais um indício de que não há intoxicação hepática ou renal.

4.4.3. Espectrometria Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman)

O *stratum corneum*, subcamada mais externa da epiderme, e responsável pela proteção do organismo e deve esta propriedade, em grande parte, à proteína queratina, proteína fibrosa, cuja estabilização se dá pelas pontes dissulfeto.

A espectrometria Raman é capaz de identificar a banda vibracional cuja freqüência é correspondente à ligação S-S, no entanto esta banda é infimamente intensa quando se trata de pele. Devido à impossibilidade de visualizar o rompimento da ligação S-S, pelo desaparecimento de sua banda característica, selecionou-se outra região para avaliação deste processo. É sabido que, ao se romperem as pontes dissulfeto e também as interações

hidrofóbicas que mantêm a estrutura de α-hélice, esta é desestabilizada perdendo sua conformação, podendo passar a β-sheet ou random coil. Esta perda de conformação α-hélice é caracterizada pelo alargamento da banda em 1657 nm.

Desta forma, para confirmar o mecanismo proposto para reação, de rompimento das pontes dissulfeto, é possível observar se houve ou não alargamento desta banda característica, uma vez que, havendo rompimento das ligações S-S haverá a desestabilização da estrutura secundária da proteína queratina.

Nas figuras 38 a 41é possível visualizar os espectros obtidos a partir da análise de fragmentos do dorso dos animais submetidos ao tratamento de cada grupo experimental e a comparação entre cada período para todos os grupos.

Em todos os espectros observa-se a banda característica do estiramento ν (C=O) amida I, da α-hélice em 1657 cm^{-1}. Observa-se ainda uma banda aguda em 1445 cm^{-1}, característica de deformação angular (*scissoring*) de CH_2. As demais bandas e suas atribuições estão relacionadas na tabela 18.

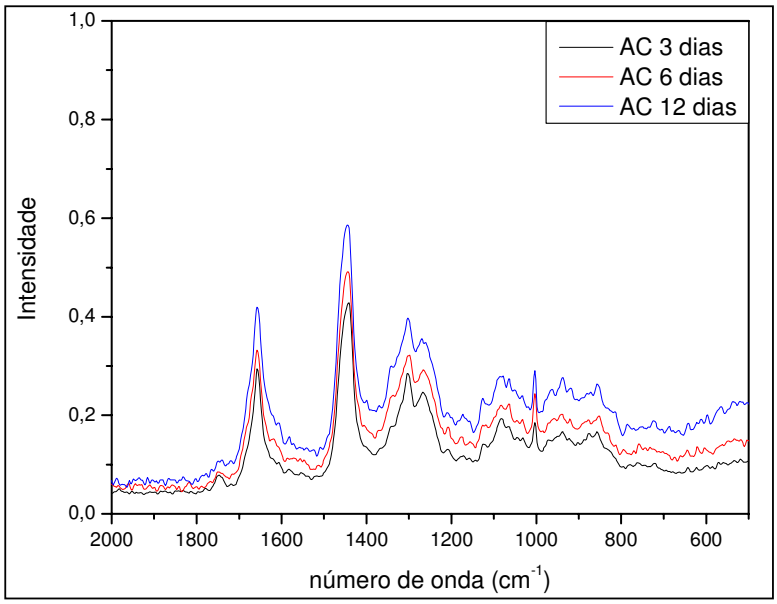


Figura 38 - Espectros FT-Raman (2000 a 500cm^{-1}) dos fragmentos de pele dorsal dos animais pertencentes ao grupo 1 (aplicação de amostra comercial).

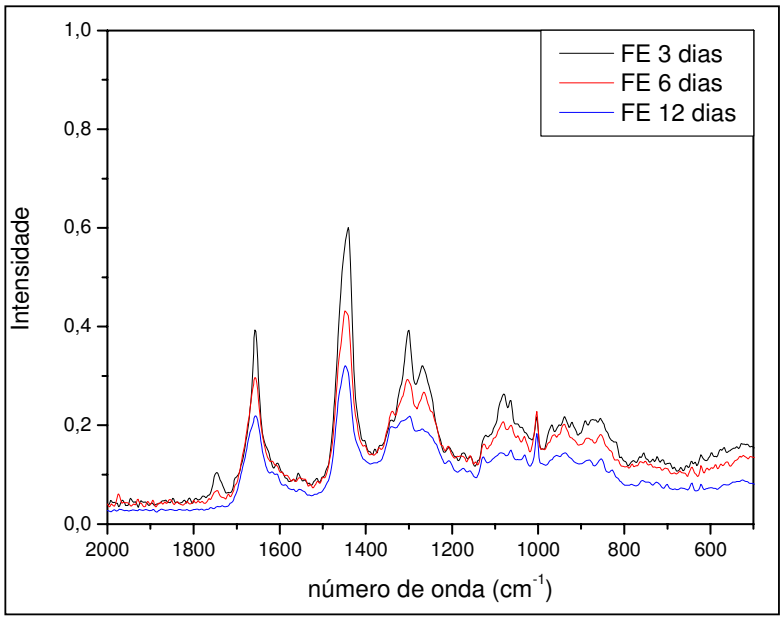


Figura 39 - Espectros FT-Raman (2000 a 500cm^{-1}) dos fragmentos de pele dorsal dos animais pertencentes ao grupo 2 (aplicação de fenol).

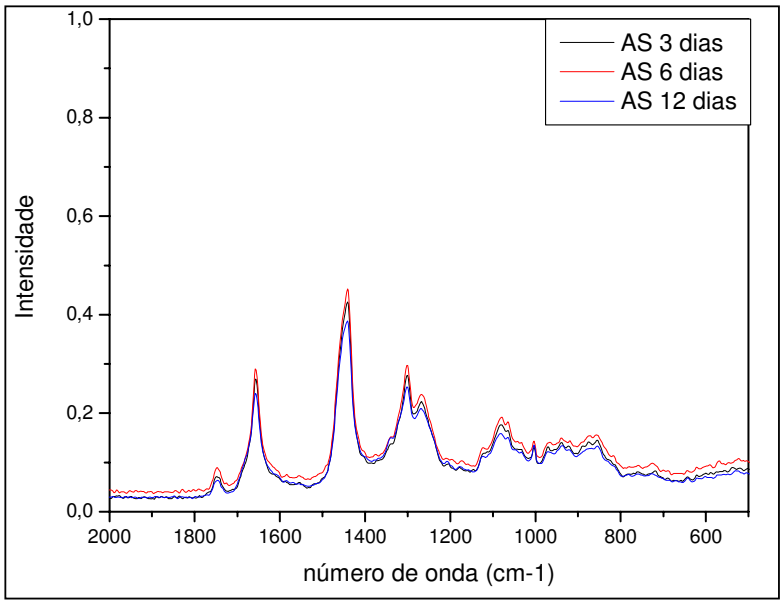


Figura 40 - Espectros FT-Raman (2000 a 500cm^{-1}) dos fragmentos de pele dorsal dos animais pertencentes ao grupo3 (aplicação de ácido salicílico).

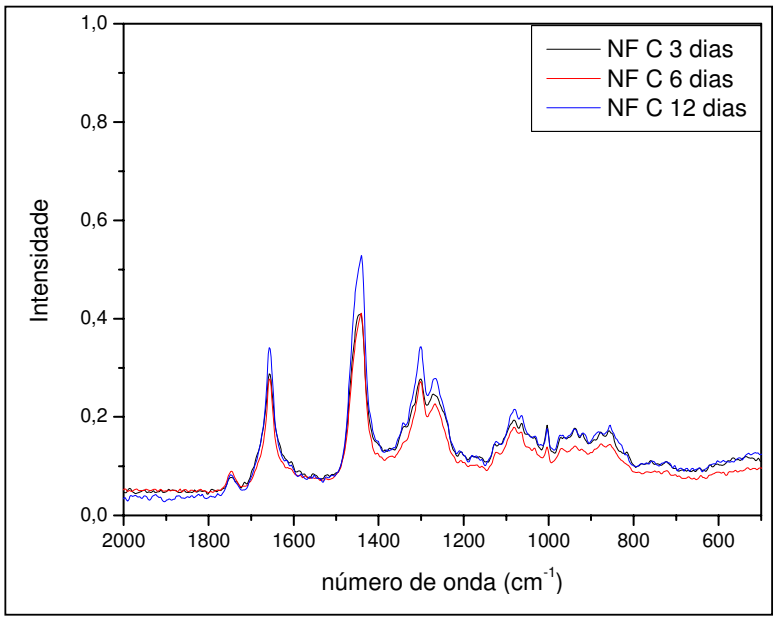


Figura 41 - Espectros FT-Raman (2000 a 500cm^{-1}) dos fragmentos de pele dorsal dos animais pertencentes ao grupo 4 (nova formulação C).

Tabela 18 – Freqüências de absorção (cm^{-1}) no FT-Raman e atribuição dos modos vibracionais para pele (*stratum corneum*).

1657	ν (C=O) amida I – α-hélice
1445	δ (CH_2) *scissoring*
1299	δ (CH_2)
1130	ν (CC) esqueleto carbônico, conformação *trans*
1086	ν (CC) esqueleto carbônico, conformação randômica
1062	ν (CC) esqueleto carbônico
1034	ν (CC) esqueleto carbônico, conformação *cis*
1006	ν (CC) anel aromático
937	ρ (CH_3)terminal ν (CC) α-hélice
853	ρ (CCH) anel aromático

* ν – estiramento, δ – deformação, ρ - rotação

Adaptado de: WILLIAMS et al., 1994; FARIA e SOUZA, 1999

Para todos os grupos, principalmente grupos 1 e 2 – amostra comercial e fenol, respectivamente – é possível notar um alargamento da banda característica do estiramento C=O da α-hélice, o que caracterizaria a perda de conformação de α-hélice. No entanto, não se pode tomar seu valor absoluto de intensidade para obter um perfil de tendência com o tempo, uma vez que deve se levar em consideração a heterogeneidade da matriz (pele) e outros fatores que influenciam na intensidade absoluta de cada absorção.

Desta forma, para poder traçar um perfil de comportamento em função do tempo, tomou-se a razão das intensidades das bandas em 1657 cm^{-1} e 1445 cm^{-1}, uma vez que a segunda não é afetada pelo tratamento e pode servir como padrão interno da amostra.

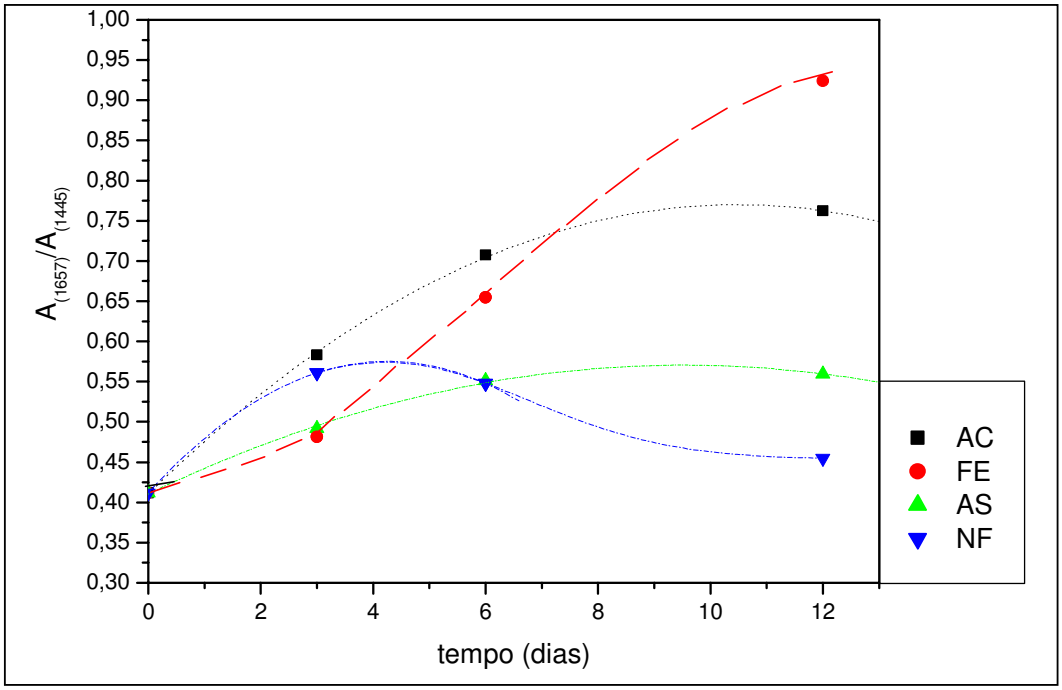


Figura 42 - Gráfico da variação da razão $A_{(1657)}/A_{(1445)}$ em função do tempo.

A partir deste gráfico (Figura 42), é possível notar que tanto o grupo 1 (Amostra comercial) quanto o grupo 3 (ácido salicílico) apresentam perfil semelhante, apesar de intensidades diferentes, mostrando a perda de conformação α-hélice até certo ponto e posteriormente uma tendência a restituir esta estrutura. Já o grupo 2 (fenol) mostrou-se muito agressivo durante todo o período avaliado, com grande diminuição da estrutura da queratina

em conformação α-hélice e mostrando a tendência de reestruturação da proteína bem posterior a este período. Já para o grupo 4 (nova formulação C) pôde-se observar leve alteração, onde há o alargamento da banda de 1657 cm^{-1}, até certo ponto, tendendo a estreitar novamente após o período de restituição da pele, ainda dentro do período de acompanhamento. Para cada grupo, este período de alargamento máximo da banda, ou seja, menor quantidade de proteína em conformação α-hélice, se dá em tempo diferente e pelas projeções é possível prever este período para cada grupo.

Para o grupo 1, a restituição do *stratum corneum* e, conseqüentemente, da proteína queratina, em estrutura α-hélice, se daria por volta do décimo dia após a aplicação. Já para o grupo 2, este restabelecimento só ocorreria a partir do vigésimo dia. Para o grupo 3, a partir do nono dia e para o grupo quatro a partir do quarto dia.

4.4.4. Ensaios histológicos

Foram analisados todos os grupos experimentais: controle, amostra comercial, fenol a 50%, ácido salicílico a 13% e proposta de nova formulação C como já descrito no item 3.2.3.

Foram analisados os três períodos de inflamação: 3, 6 e 12 dias, e os resultados são apresentados a seguir.

4.4.4.1. Controle

A pele do dorso dos animais pertencentes ao grupo controle apresenta espessa camada de queratina recobrindo a camada granulosa constituída por vários estratos e cujos citoplasmas encontram-se repletos de grânulos de queratohialina. A epiderme é bastante estratificada e sua camada basal possui muitas figuras de mitose. A interface derme/epiderme apresenta profundas e numerosas papilas conjuntivas, responsáveis pela manutenção da conexão entre as duas camadas (Figura 43).

A derme é constituída por feixes de fibras colágenas densamente empacotadas, mostrando que se trata de colágeno já maduro, tanto nas proximidades da camada basal quanto nas regiões mais profundas do tecido conjuntivo, em meio aos capilares sangüíneos e fibroblastos e macrófagos em número reduzido (Figuras 44 e 46).

Pela coloração tricrômio de Masson (TM) obsreva-se que há efetiva proteção do epitélio constituída pela barreira do *stratum corneum* com a queratina corada em vermelho. As células epiteliais formam vários estratos, sendo possível visualizar todas as sub-camadas da epiderme, inclusive a camada média espinhosa, *stratum spinosum*. A lâmina basal contém figuras de mitose variadas e as papilas conjuntivas são acentuadas e profundas (Figura 45).

4.4.4.2. Amostra comercial

a) Dia 3

A figura 47 mostra uma visão geral, corada em hematoxilina/eosina (HE), do corte correspondente à amostra comercial ao terceiro dia após a aplicação. Neste período nota-se espessa camada de material necrótico com queratina e inclusão de restos celulares devido ao ataque químico da amostra. O epitélio se apresenta com dimensões reduzidas salientando-se que os extratos celulares foram reduzidos à metade. Nota-se, ainda, a ausência de papilas dérmicas, o que dificulta a adesão da epiderme à derme levando ao rompimento da camada mais externa, como pode ser visto na figura 48.

Pela presença de leucócitos do tipo polimorfos nucleares é possível detectar infiltrado inflamativo leve na derme. Estes se apresentam em meio às células residentes, de aspecto normal, do tecido conjuntivo, bem como às fibras colágenas normais, como pode ser visto na figura 49.

Pela coloração tricrômio de Masson (TM) é possível notar que na camada basal da epiderme não há figuras de mitose, ou seja, as células responsáveis pela divisão celular e

conseqüente crescimento das camadas superiores estão inativas devido à agressão química sofrida. É possível observar ainda que na região de rompimento da epiderme, o tecido necrótico invade o local da lesão expondo a derme ao meio externo (Figura 50).

b) Dia 6

Ao sexto dia o quadro não muda muito, pela coloração HE, em relação ao período anterior, salientando-se apenas que houve o desprendimento do tecido necrótico do epitélio (Figuras 51 e 52).

Pelo TM observa-se a camada granulosa bem evidente com numerosos grânulos de queratohialina preenchendo o citoplasma das células, o que indica a produção de novos filamentos de queratina para recobrimento e proteção da superfície epitelial (Figuras 53 e 54). É possível notar ainda que no tecido conjuntivo da derme há hemácias que extravasaram dos vasos sangüíneos (Figura 54).

c) Dia 12

Ao décimo segundo dia após a aplicação, pode-se ainda notar espessa crosta de material necrótico, separada da pele e contendo numerosas células mortas, em sua maioria leucócitos polimorfos nucleares (Figura 55).

O tecido conjuntivo da derme está exposto com infiltrado inflamatório intenso constituído por leucócitos polimorfos nucleares. Em meio a estas células ocorrem inúmeros vasos que surgem em corte transversal, semelhantes a vasos linfáticos muito dilatados com a luz desobstruída, rodeados por acúmulos celulares, indicando que a drenagem do local será iniciada (Figura 56).

Não há ainda evidências de neoformação epitelial, deixando o tecido conjuntivo da derme exposto, recoberto apenas por tecido necrótico (Figura 57).

Pelo TM nota-se que no tecido conjuntivo exposto ao meio externo há acúmulos locais de leucócitos em processo de degeneração ou morte celular bem como ocorre a presença de

hemácias, devido ao extravasamento dos vasos. Percebe-se uma fina rede de filamentos colágenos corados em azul e, fibroblastos e outras células residentes do tecido conjuntivo estão praticamente ausentes, apresentando-se inativas devido ao processo inflamatório, ainda não concluído (Figura 59).

4.4.4.3. Fenol

a) Dia 3

Ao terceiro dia após a aplicação de fenol, nota-se o rompimento epitelial tornando o tecido conjuntivo da derme exposto, sendo recoberto parcialmente por material necrótico amorfo basicamente composto por restos celulares originários dos leucócitos (Figura 60).

O tecido conjuntivo adjacente da derme apresenta densos feixes colágenos acompanhados de acentuada inflamação formada por leucócitos em degeneração (Figura 61).

Pelo TM é possível visualizar que a camada de material amorfo (crosta) que recobre o tecido conjuntivo é formada por células mortas e sangue (Figura 62). Nota-se ainda inflamação acentuada na derme, com os vasos sangüíneos prejudicados por rompimento endotelial, congestão e estase sangüínea (Figura 63).

b) Dia 6

Ao sexto dia, o comprometimento epitelial é bem acentuado. As poucas camadas estão desorganizadas e a crosta de material necrótico sobre a epiderme é bastante espessa. A derme apresenta-se fragmentada tanto com relação às células quanto às fibras colágenas, como pode ser visto nas figuras 64 e 65.

Pela figura 66, nota-se que no tecido conjuntivo da derme há intenso infiltrado inflamatório formado por leucócitos polimorfos nucleares e monócitos.

Pela coloração TM nota-se também o rompimento e desorganização do epitélio, e seu recobrimento por crosta de material necrótico (Figura 67). A derme também se apresenta desorganizada com a presença de leucócitos, indicando inflamação acentuada (Figura 68).

c) Dia 12

Ao décimo segundo dia é possível visualizar uma camada fina e delicada de queratina cobrindo a superfície da pele. O epitélio se apresenta constituído por cerca de 10 estratos e as células da camada granulosa apresentam-se com grande quantidade de grânulos de queratohialina. Ainda não há papilas conjuntivas, mas o tecido é rico em fibrilas colágenas frouxamente dispostas entre os fibroblastos (Figura 69).

Pela coloração TM também é possível observar a ausência de papilas conjuntivas e a presença de hemácias na derme (Figura 70).

4.4.4.4. Ácido Salicílico

a) Dia 3

Ao terceiro dia após a aplicação do ácido salicílico sobre a pele dos animais pôde-se notar a formação de uma crosta endurecida, sobre a pele, constituída por restos celulares, material amorfo e queratina. O epitélio adjacente apresenta fina camada de queratina compactada, seguida de vários estratos celulares da rica camada granulosa. O epitélio é espesso, formado por 12 camadas celulares. No entanto, sua camada basal apresenta-se com poucas figuras de mitose e não há papilas conjuntivas.(Figuras 71 e 72).

Ainda pela coloração HE é possível notar que o tecido conjuntivo da derme apresenta fibroblastos e macrófagos, bem como vasos sangüíneos de aspecto normal. Há a presença de fibrilas colágenas frouxamente dispostas junto aos fibroblastos (Figura 73).

A figura 74 mostra uma visão geral do corte que recebeu aplicação de ácido salicílico corado por TM. Por esta coloração nota-se a queratina corada em vermelho, recobrindo o

epitélio, seguida da camada granulosa fortemente corada. Apesar da ausência de papilas conjuntivas, é possível visualizar figuras de mitose na camada basal, indicando que o processo de restituição do epitélio já foi iniciado pela produção de novas células pelo *stratum germinatum* (Figura 75).

Na derme ainda é possível visualizar ligeira hiperemia vascular e a presença de leucócitos esparsos no tecido conjuntivo. As fibras colágenas, coradas em azul, estão sendo formadas, apresentando-se em pequenos e curtos feixes dispostos aleatoriamente entre os fibroblastos (Figura 76). A presença destes feixes novos de colágeno salienta que os fibroblastos estão ativos, o que mostra que não há mais atividade inflamatória na derme.

b) Dia 6

Ao sexto dia o epitélio apresenta-se recoberto por fina camada de queratina e há cerca de 8 estratos epiteliais. Na camada basal é possível notar a presença de figuras de mitose e a camada superficial com granulócitos (Figura 77).

A camada de queratina que recobre o epitélio é nitidamente vista pela coloração TM, apresentando-se em finas placas. As células do *stratum granulosum* contêm grande quantidade de grânulos de queratohialina em seu citoplasma, mostrando que a produção de queratina ainda está em curso. O tecido conjuntivo da derme apresenta fibrilas colágenas coradas em azul, em meio aos fibroblastos, mas na interface epiderme/derme ainda não se observam papilas conjuntivas (Figura 78).

c) Dia 12

Neste período a camada de queratina apresenta-se fina, formada por filamentos frouxamente empacotados. O epitélio é formado por poucos estratos, cerca de 4 a 5 camadas de células. As papilas conjuntivas já estão presentes, mas ainda são poucas, curtas e espaçadas (Figura 79). Na derme o tecido conjuntivo apresenta densos feixes colágenos em meio aos fibroblastos e não há nenhum sinal de inflamação.

4.4.4.5. Proposta de nova formulação C

a) Dia 3

Ao terceiro dia após a aplicação da proposta de nova formulação observou-se fina camada de queratina formada por filamentos frouxamente dispostos sobre o epitélio e camada granulosa estreita, bem como o epitélio como um todo, apresentando de 8 a 10 camadas (Figura 82 e 83).

A incidência de papilas conjuntivas na interface derme/epiderme é baixa, mas não há evidências de inflamação. Na derme há feixes colágenos em meio aos fibroblastos e macrófagos ativos (Figuras 84 e 85). Nota-se pela figura 85 que parte do *stratum corneum* está descolado da superfície epitelial.

b) Dia 6

Ao sexto dia é possível visualizar a camada de queratina formada por filamentos finos e epitélio com oito a dez camadas. A camada basal apresenta figuras de mitose e numerosas papilas conjuntivas e a camada granulosa está pouco evidente (Figuras 86 e 88).

Na derme os feixes colágenos estão distribuídos em meio aos fibroblastos e numerosos macrófagos ativos (Figuras 87 e 89).

c) Dia 12

Ao décimo segundo dia é possível notar o aumento da espessura da epiderme com os filamentos de queratina formando uma faixa larga sobre o epitélio, tanto pela coloração HE, quanto pela coloração TM. As células da camada granulosa se apresentam exuberantes, com seus citoplasmas repletos de grânulos de queratohialina (Figuras 90 e 93).

A camada basal mostra-se repleta de figuras de mitose e a derme contém feixes de colágeno maduro, mais escuros e afastados da epiderme, e imaturo, corados em azul claro e adjacente à camada basal da epiderme, em meio aos fibroblastos e macrófagos ativos (Figuras 91 e 92).

As figuras 80 e 81 mostram cortes corados por TM, onde é possível visualizar bem os grânulos de queratohialina da camada granulosa, os finos filamentos de queratina e as fibras colágenas maduras, na derme, formando feixes em meio aos fibroblastos.

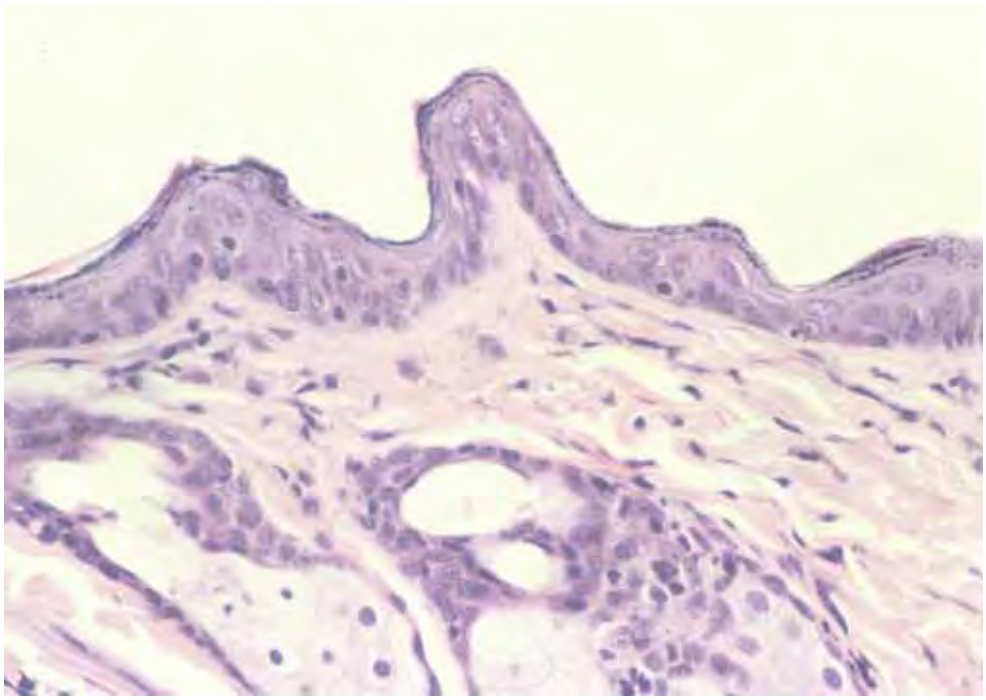


Figura 43 – Corte histológico do grupo controle, coloração HE, epitélio e conjuntivo da derme normais.

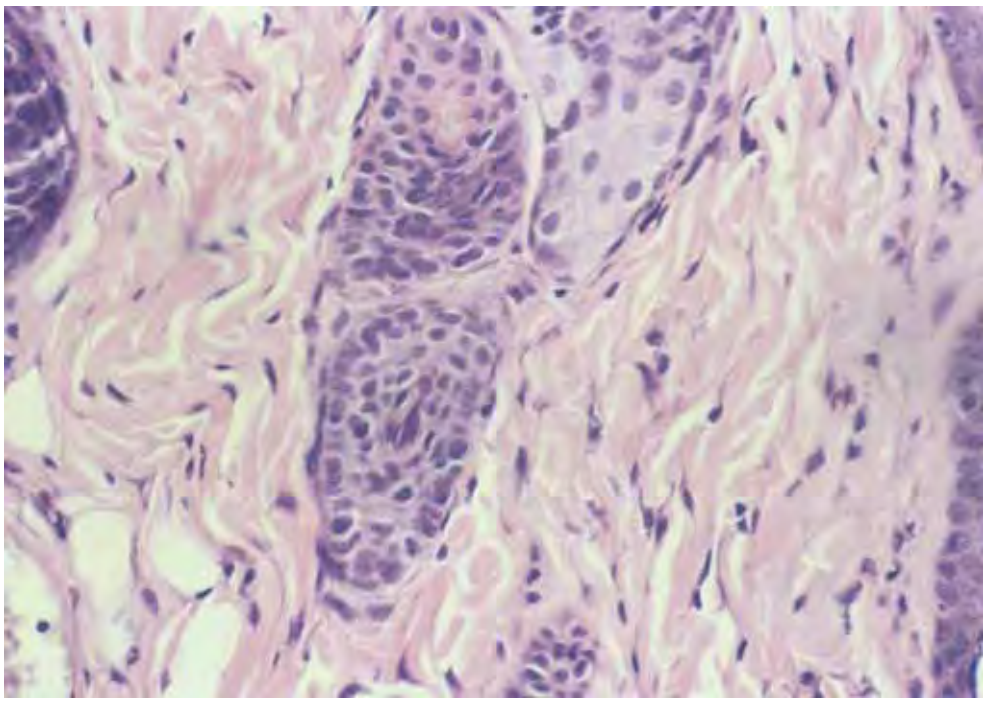


Figura 44 – Corte histológico do grupo controle, coloração HE, colágeno maduro da derme.

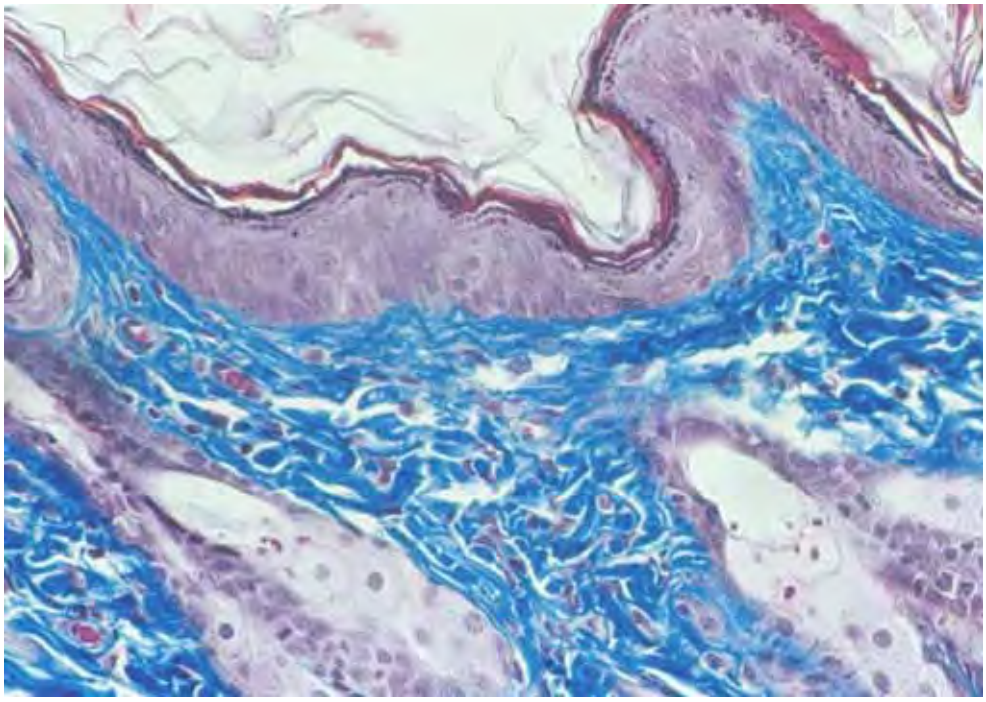


Figura 45 – Corte histológico do grupo controle, coloração TM, epitélio e conjuntivo da derme normais.

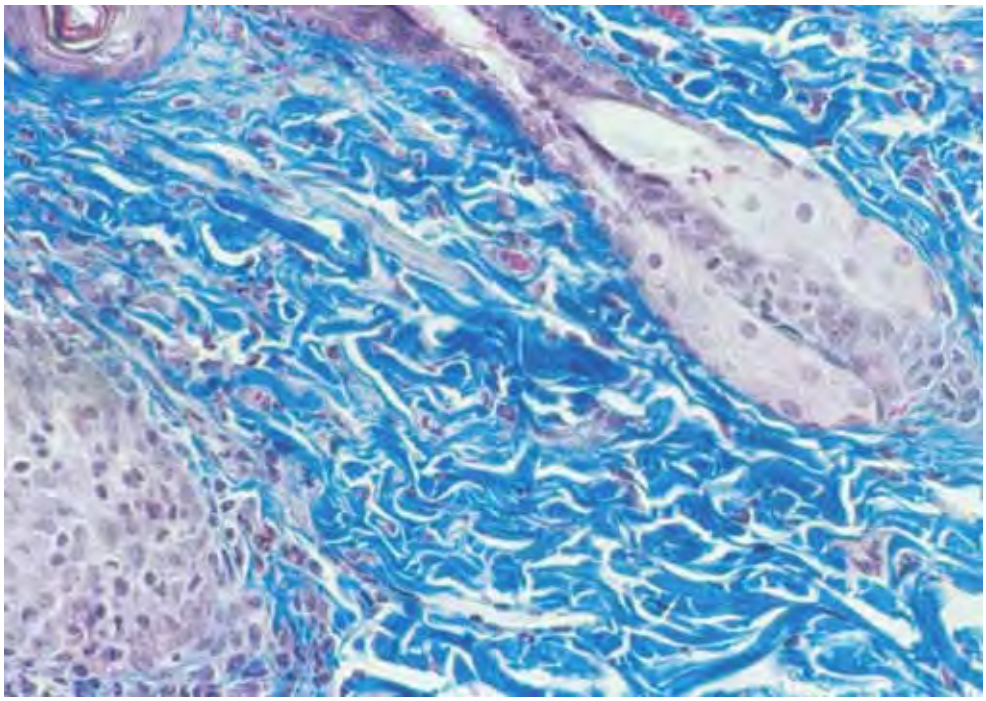


Figura 46 – Corte histológico do grupo controle, coloração HE, derme com densos feixes colágenos.

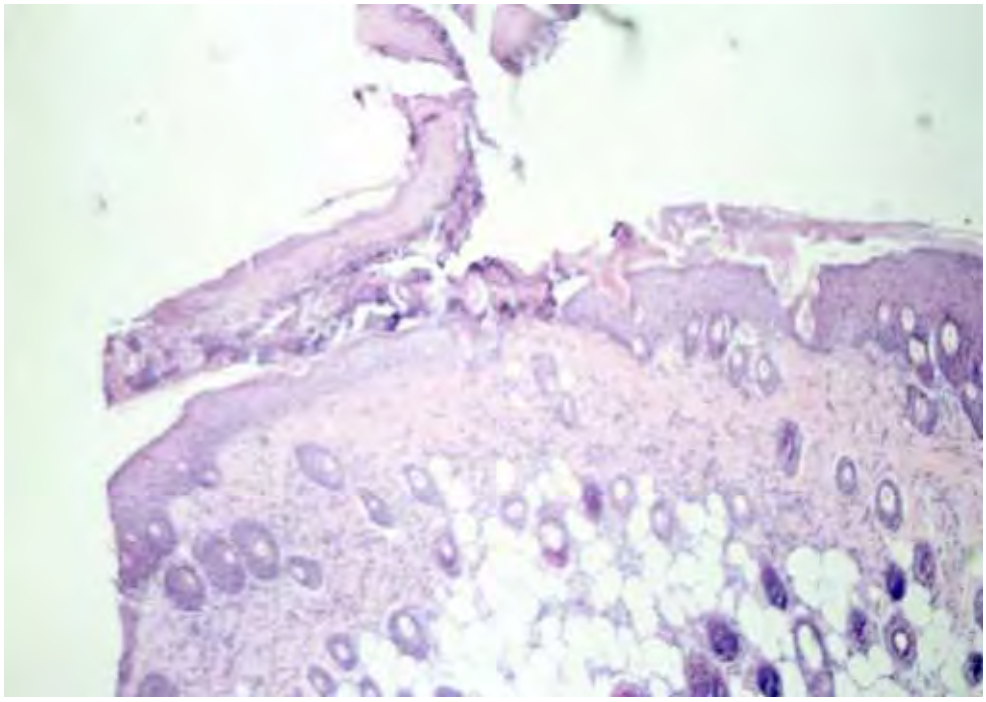


Figura 47 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 3º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral.

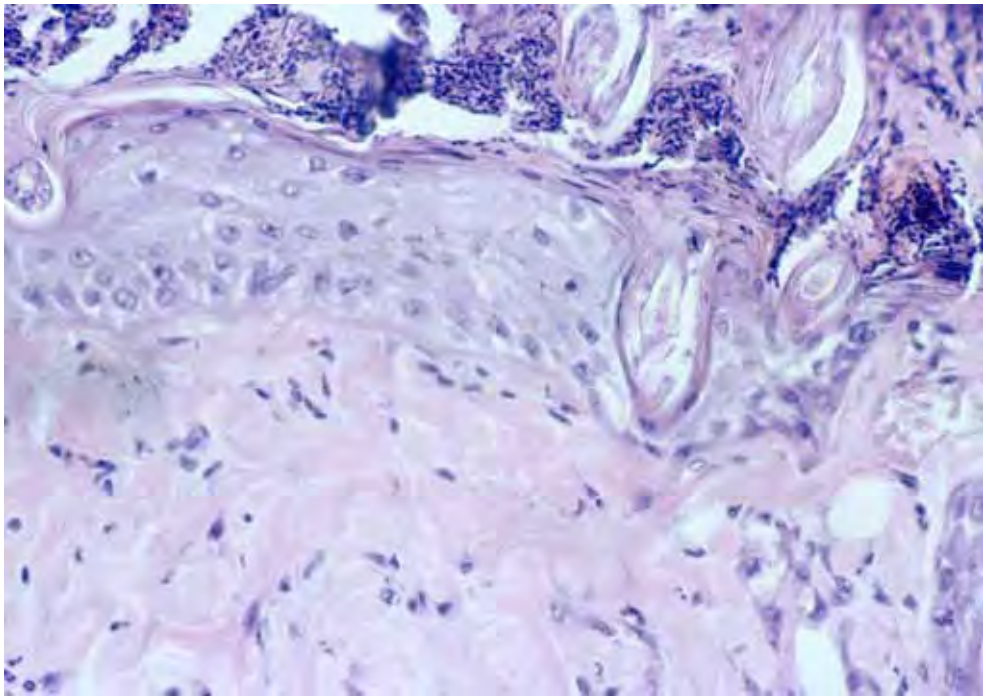


Figura 48 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 3º dia após a aplicação, coloração HE, ausência de papilas conjuntivas.

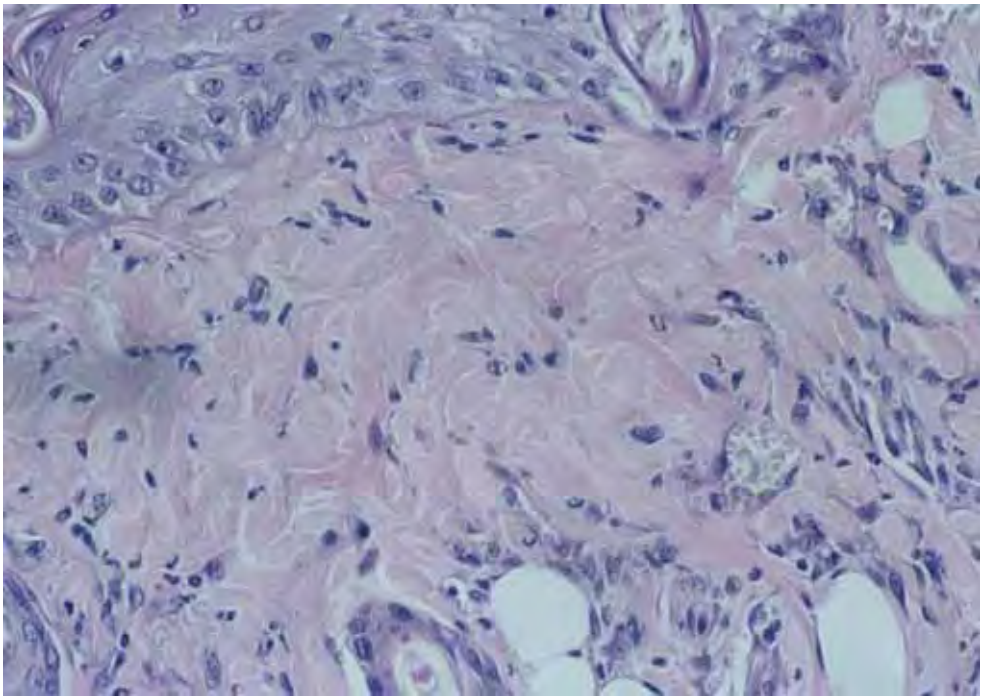


Figura 49 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 3º dia após a aplicação, coloração HE, sinais de inflamação leve.

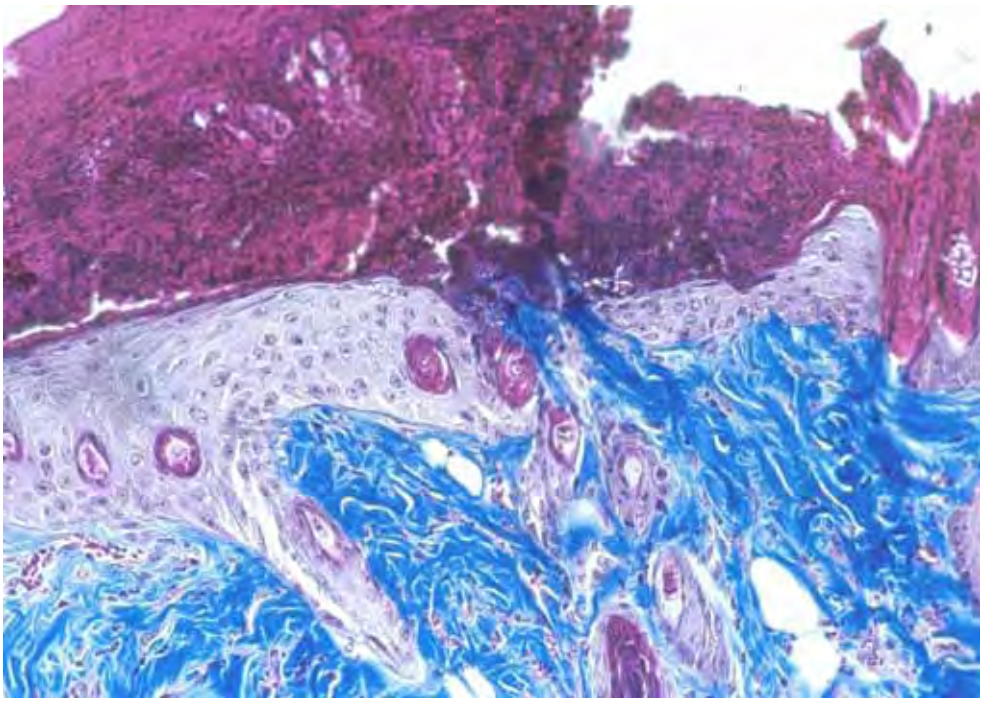


Figura 50 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 3º dia após a aplicação, coloração TM, ausência de figuras de mitose e rompimento do tecido epitelial.

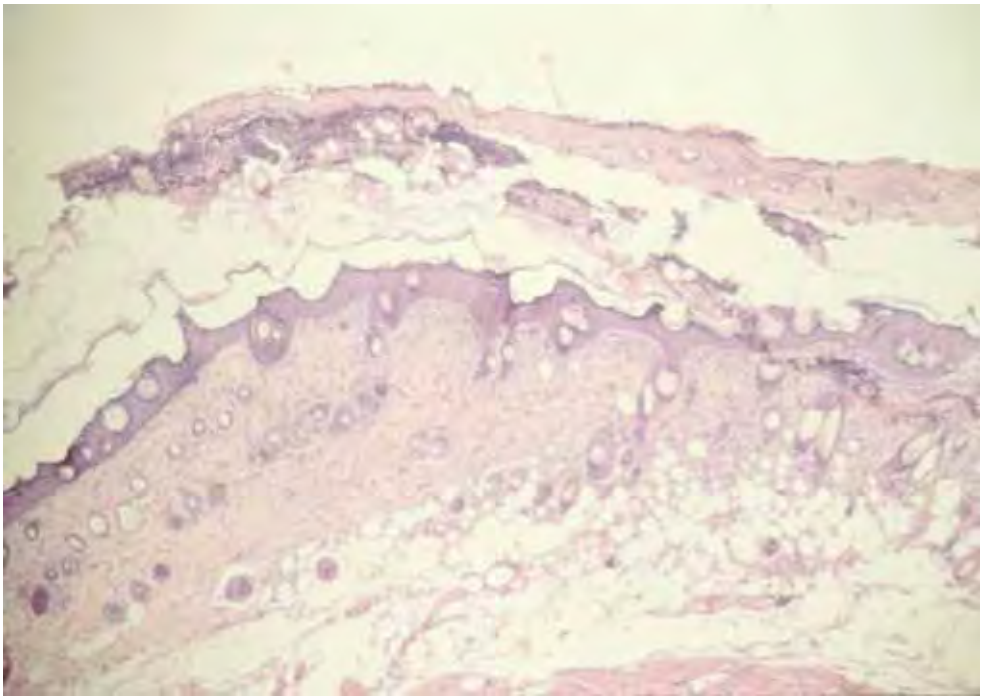


Figura 51 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral.

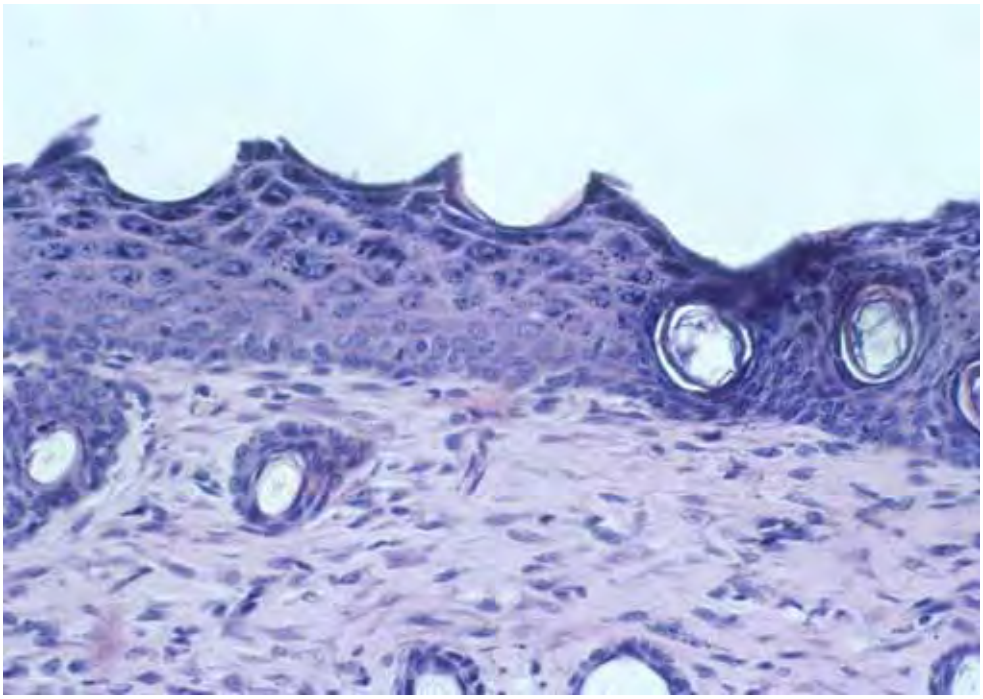


Figura 52 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração HE, ausência de papilas conjuntivas.

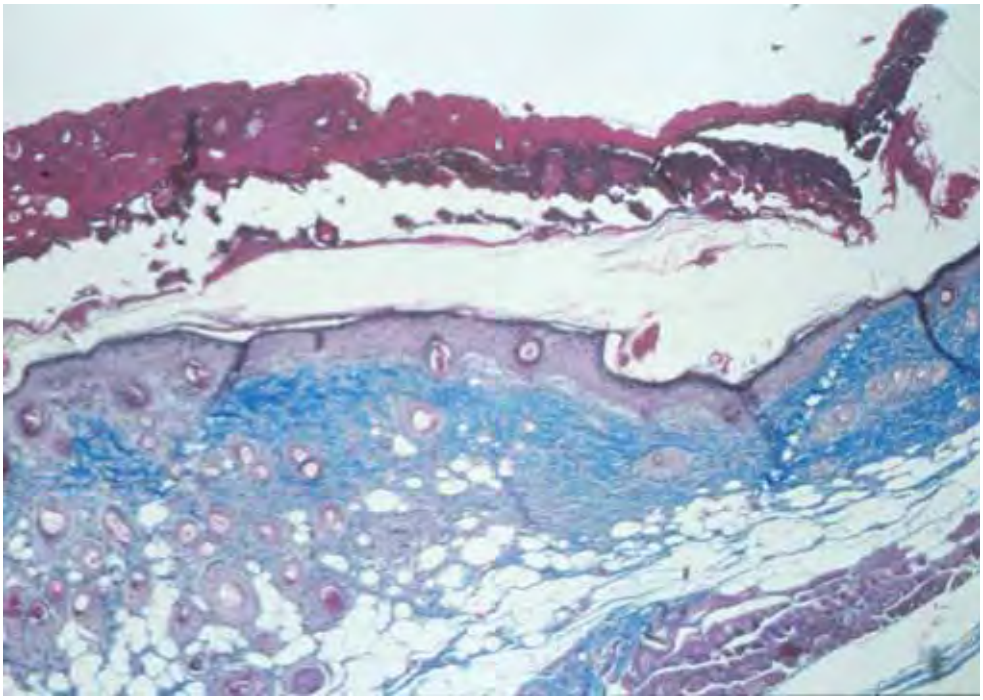


Figura 53 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral.

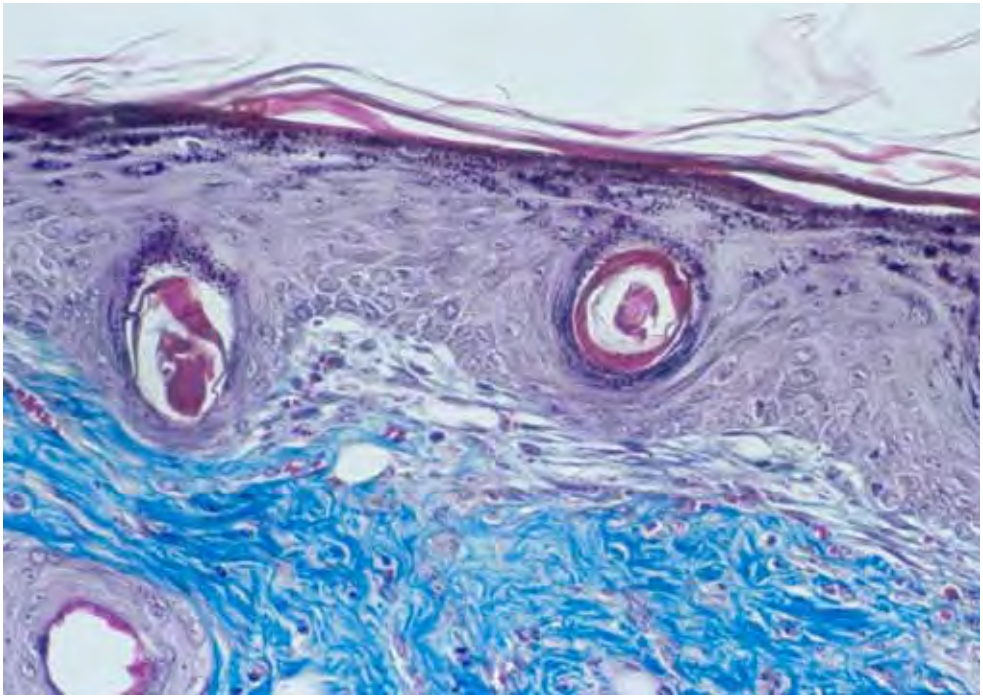


Figura 54 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração TM, epiderme e camada granulosa .

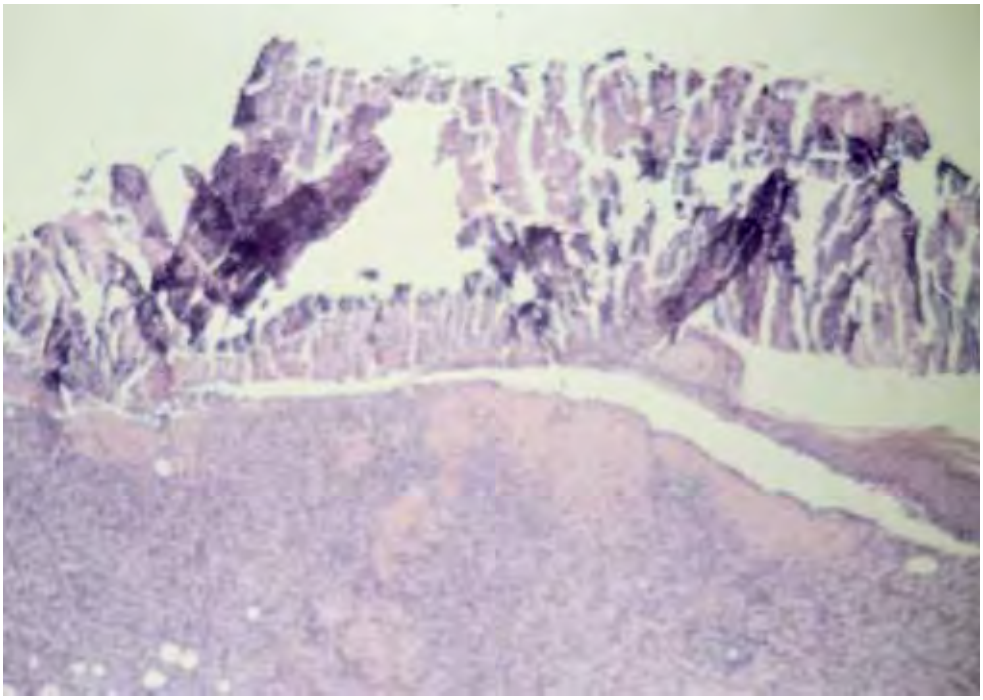


Figura 55 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 12º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral.

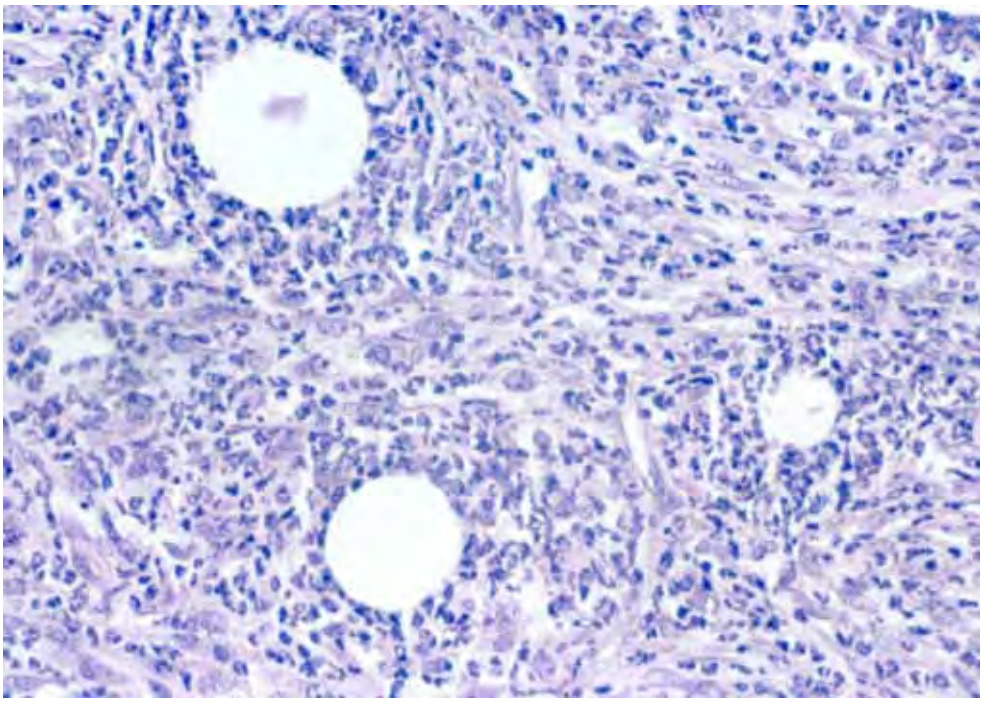


Figura 56 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 12º dia após a aplicação, coloração HE, infiltrado inflamatório e vasos linfáticos.

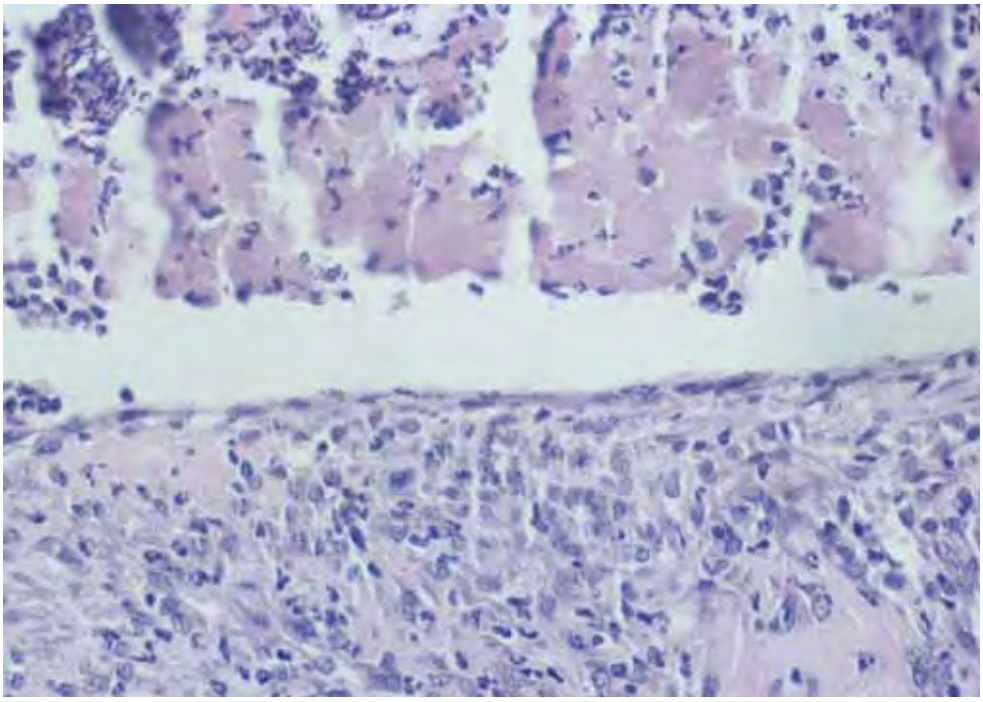


Figura 57 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 12º dia após a aplicação, coloração HE, exposição do tecido conjuntivo dermal.

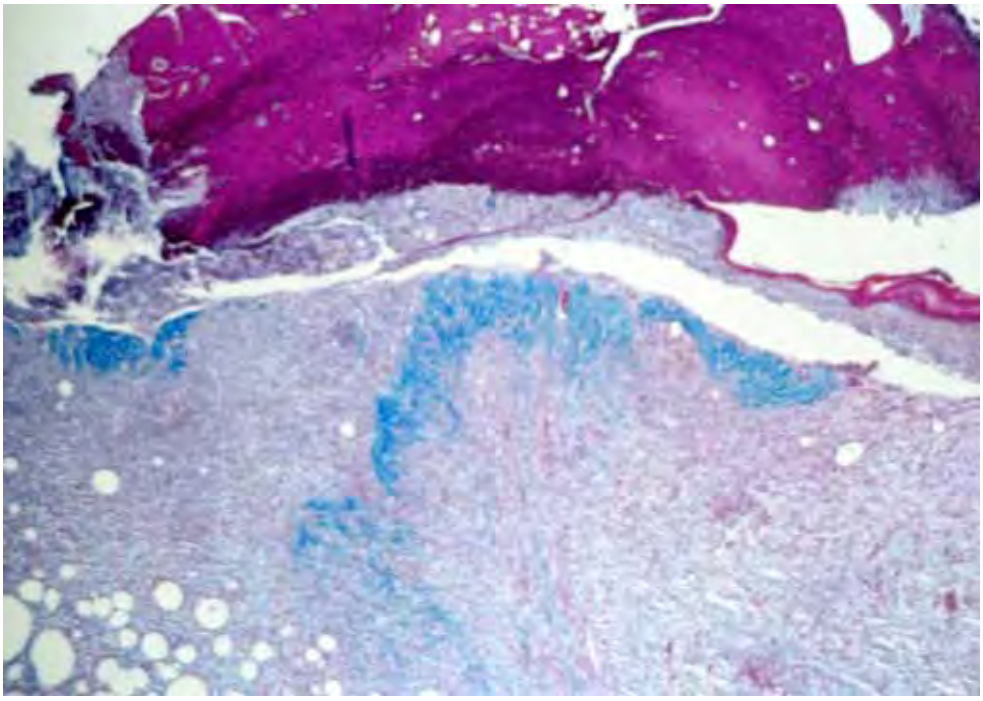


Figura 58 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 12º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral.

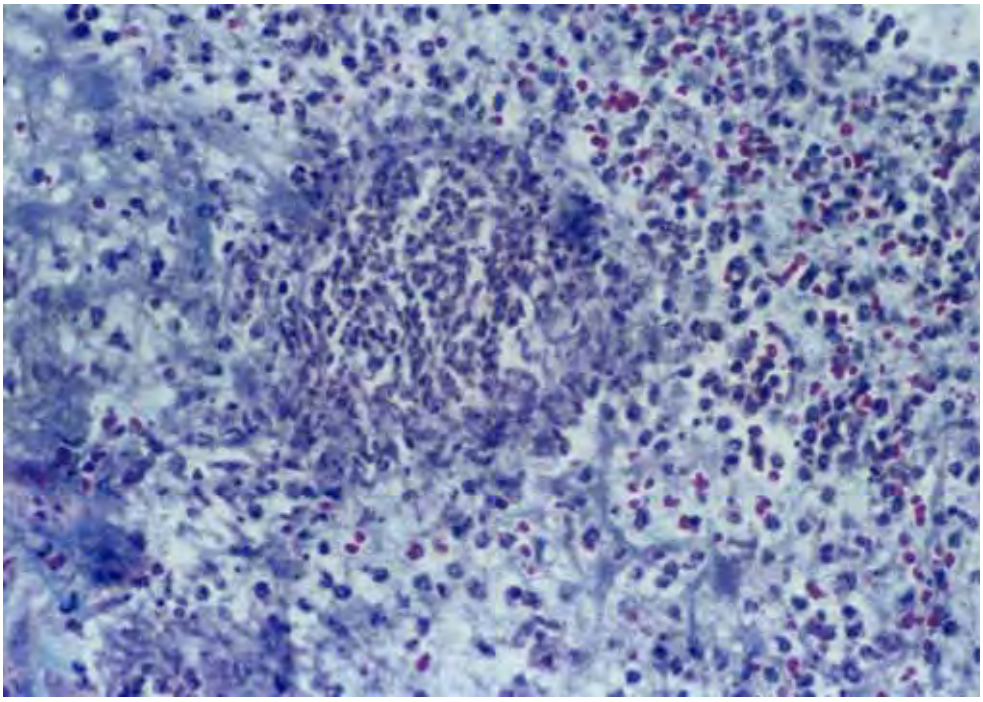


Figura 59 – Corte histológico do grupo 1 (amostra comercial), 6º dia após a aplicação, coloração TM, acumulado de leucócitos.

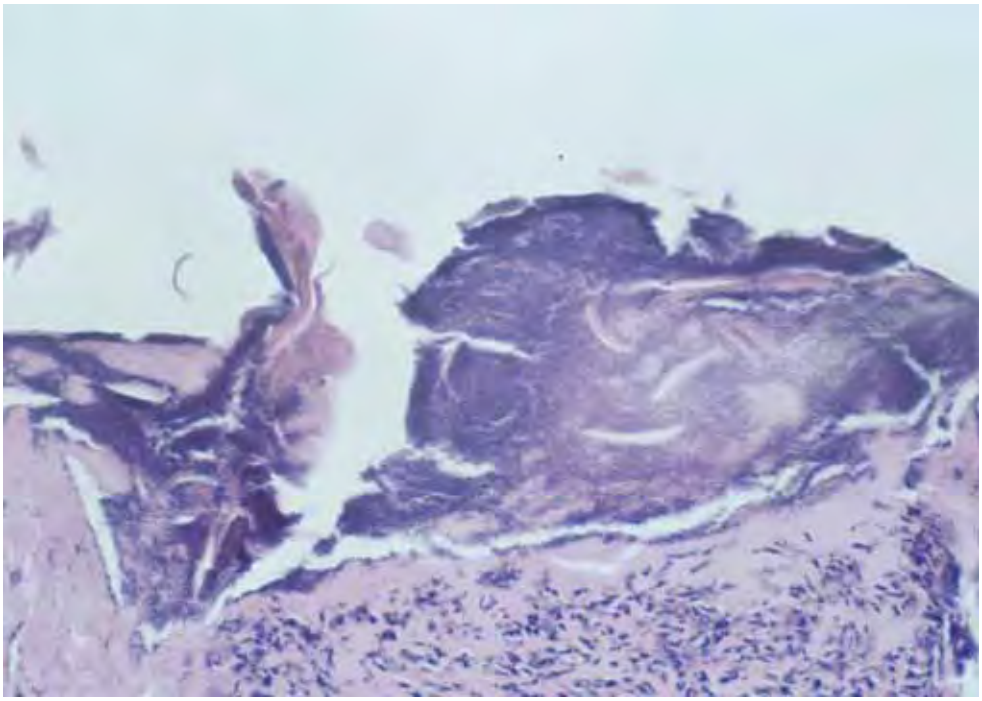


Figura 60 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 3º dia após a aplicação, coloração HE, exposição do conjuntivo com crosta de material necrótico.

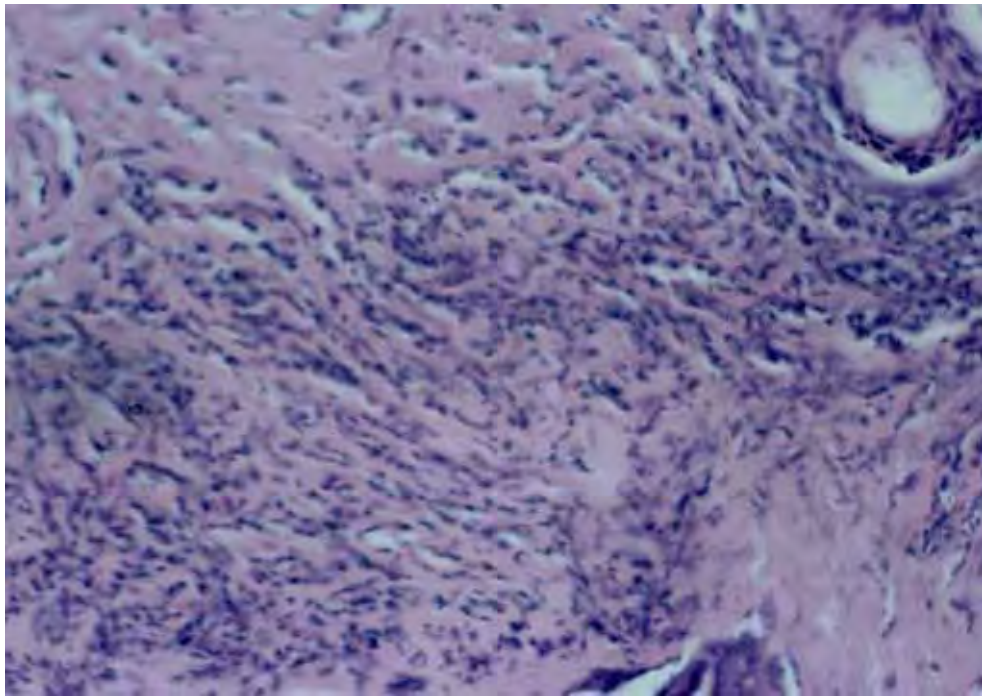


Figura 61 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 3º dia após a aplicação, coloração HE, conjuntivo dermal com inflamação.

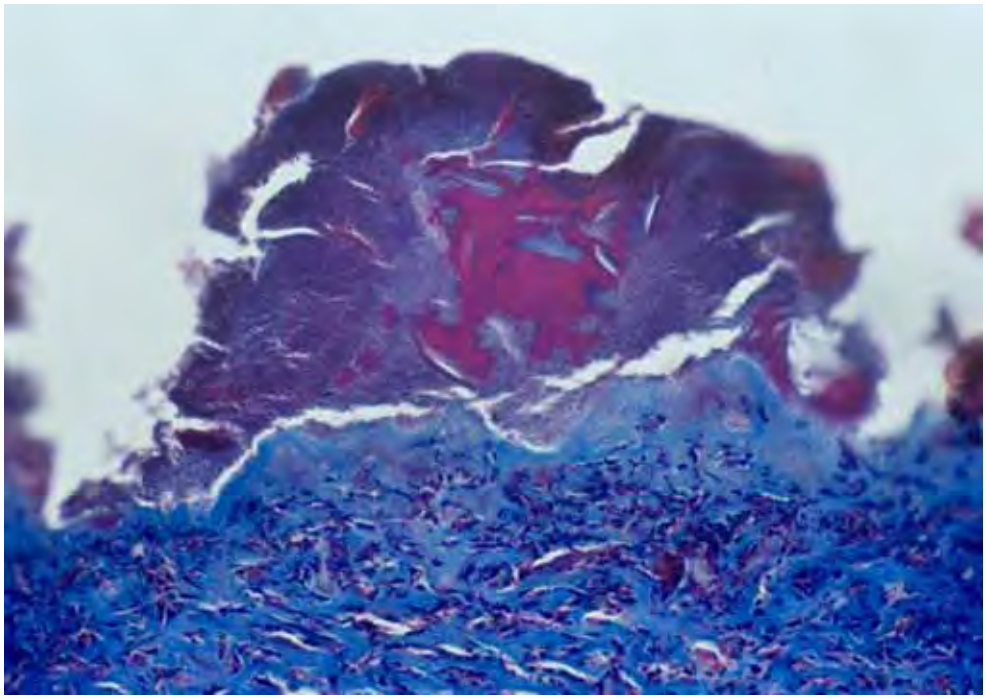


Figura 62 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 3º dia após a aplicação, coloração TM, crosta de material necrótico recobrindo o conjuntivo.

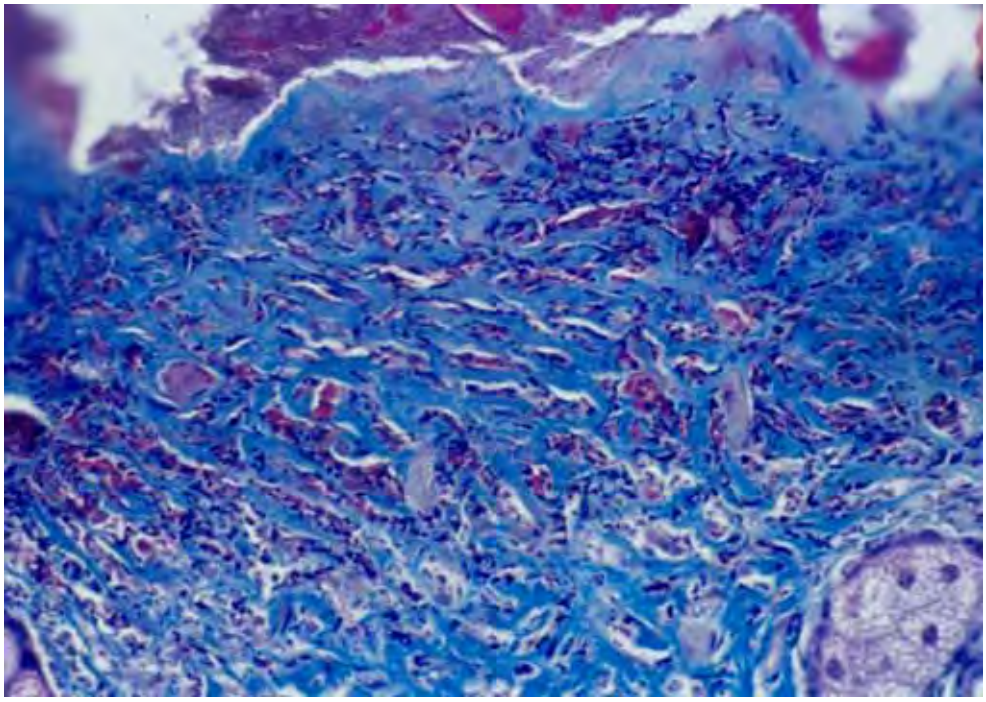


Figura 63 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 3º dia após a aplicação, coloração HE, vasos sangüíneos comprometidos.

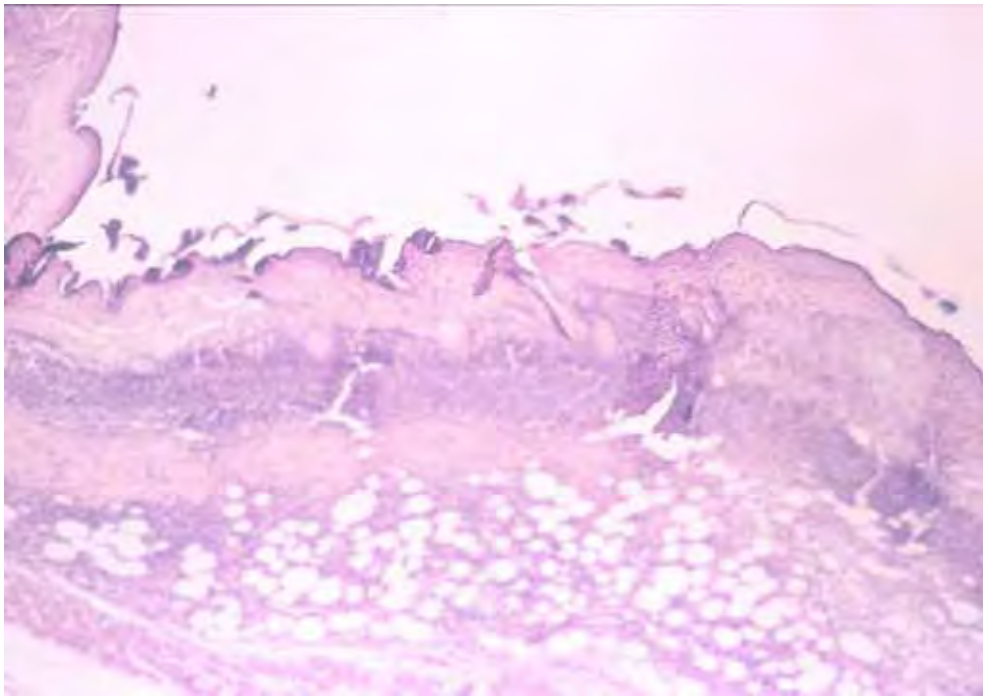


Figura 64 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral.

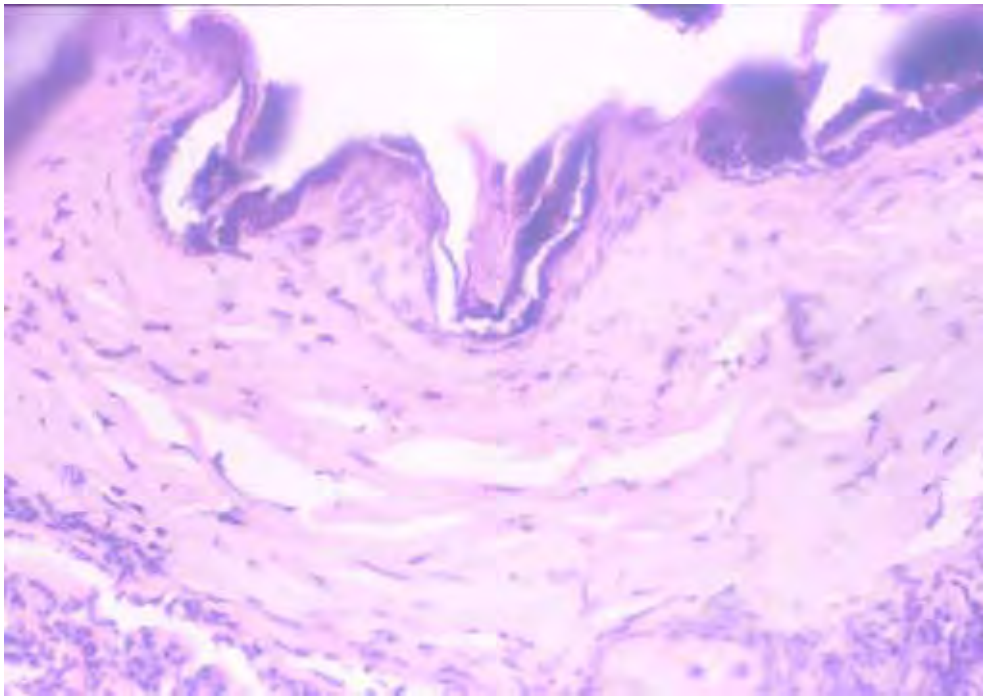


Figura 65 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração HE, completa desorganização epitelial.

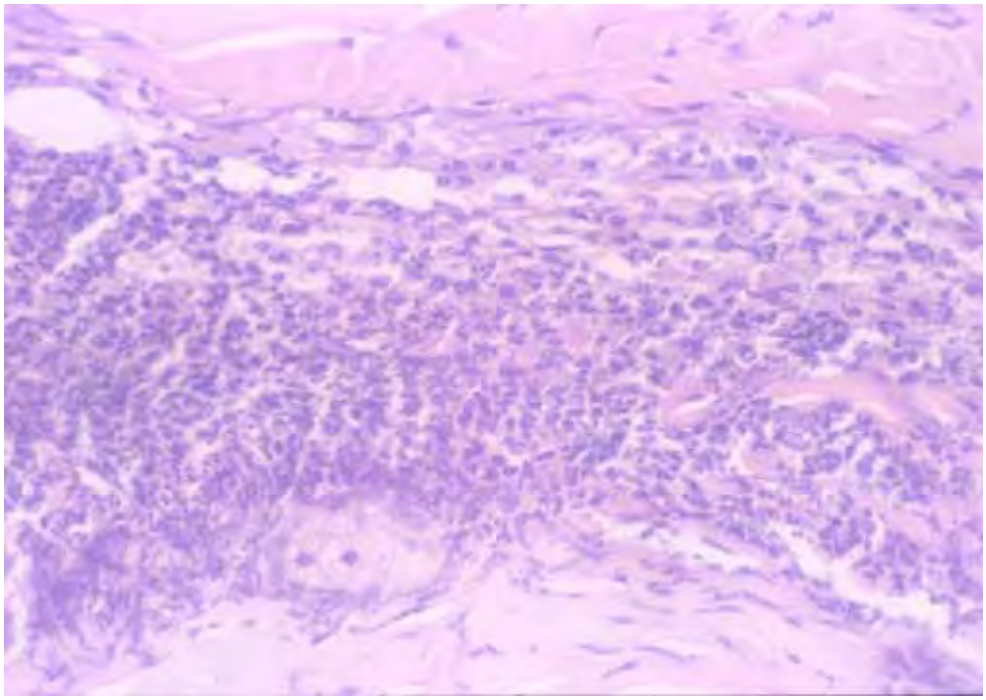


Figura 66 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração HE, infiltrado inflamatório profundo.

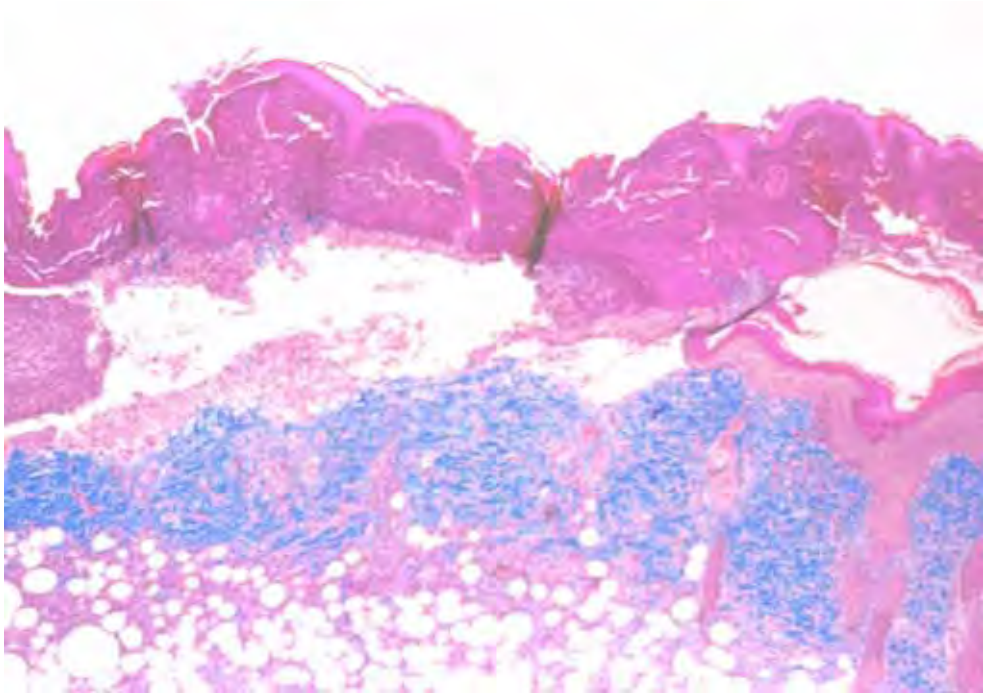


Figura 67 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral.

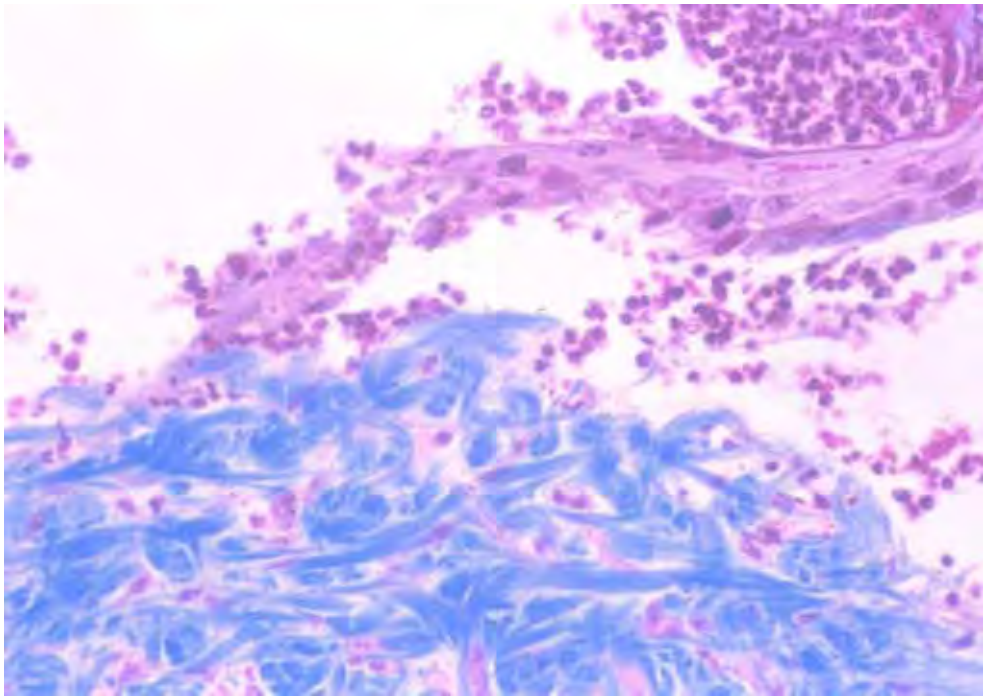


Figura 68 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 6º dia após a aplicação, coloração TM, desorganização dermal.

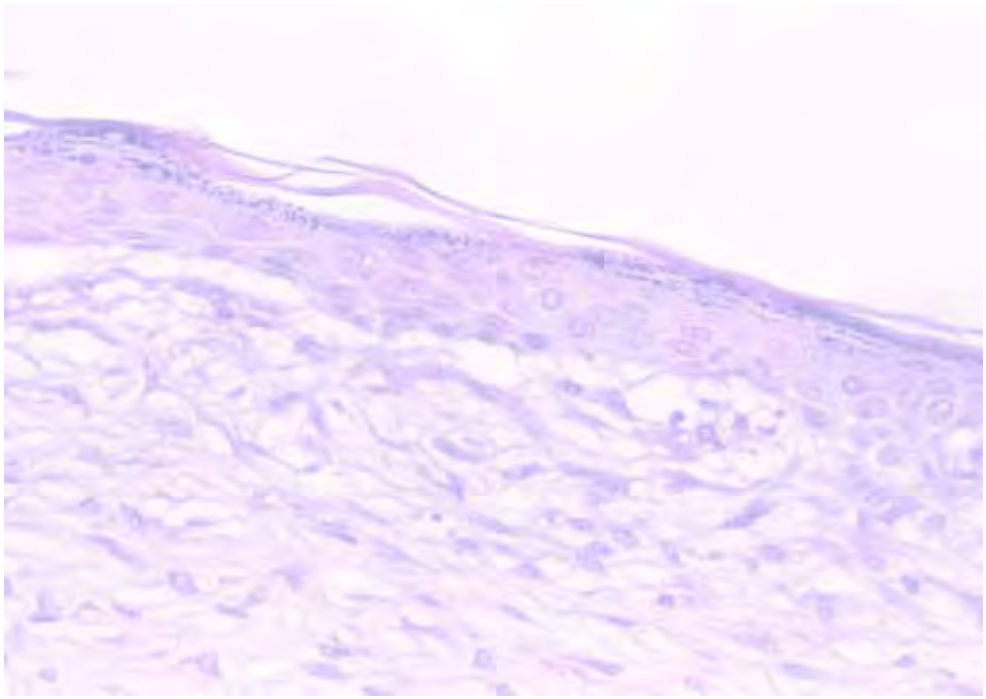


Figura 69 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 12º dia após a aplicação, coloração HE, epitélio sem papilas conjuntivas.

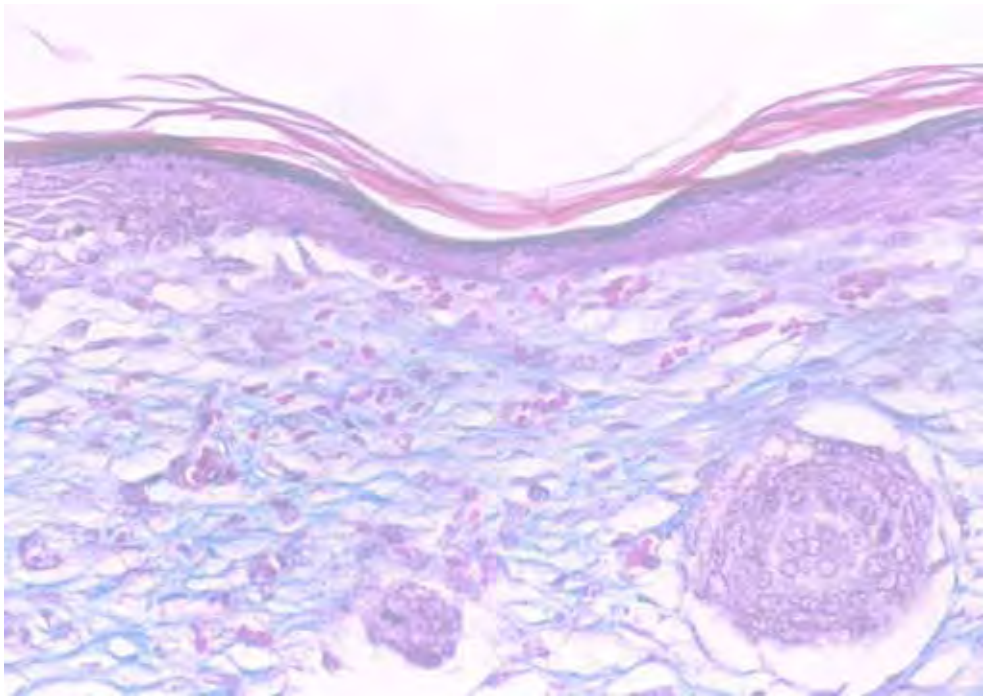


Figura 70 – Corte histológico do grupo 2 (fenol), 12º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio fino sem papilas conjuntivas.

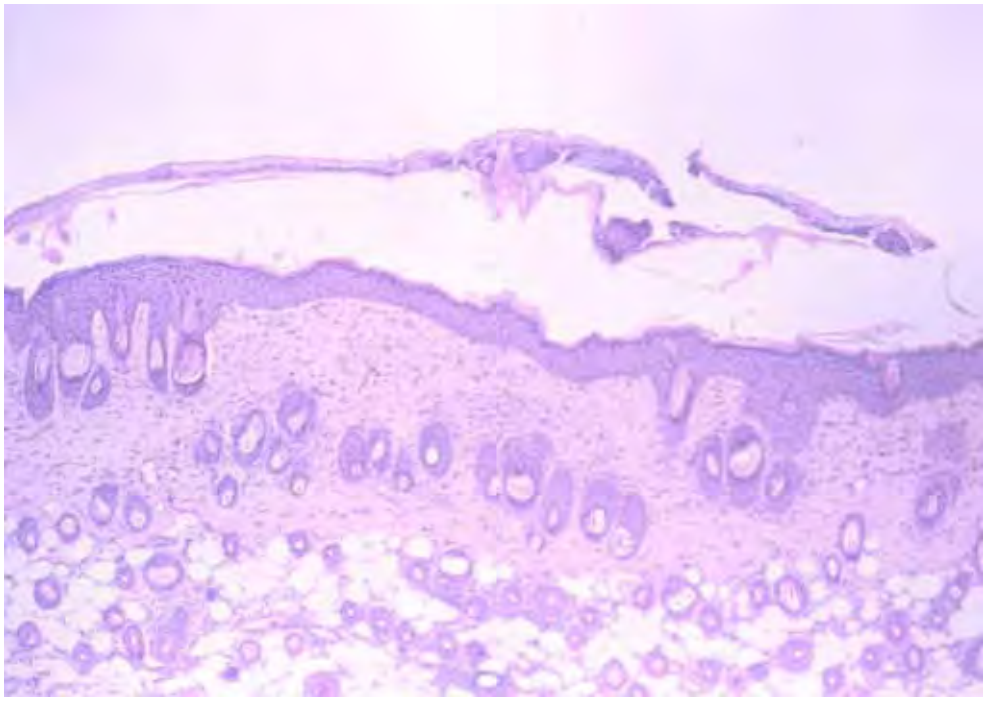


Figura 71 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral.

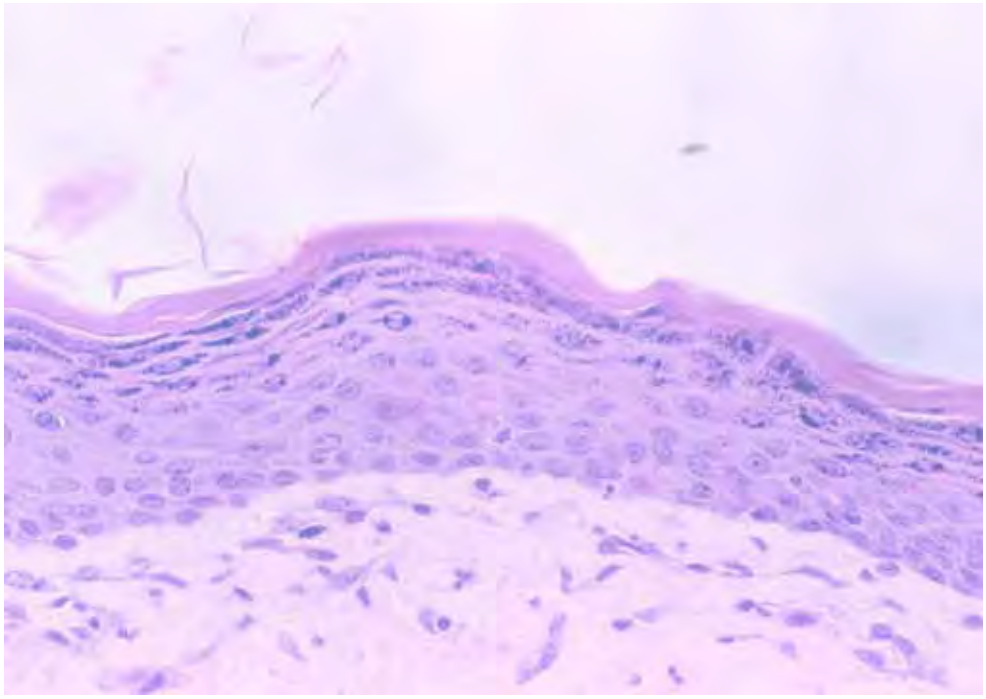


Figura 72 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração HE, epitélio normal, sem papilas conjuntivas.

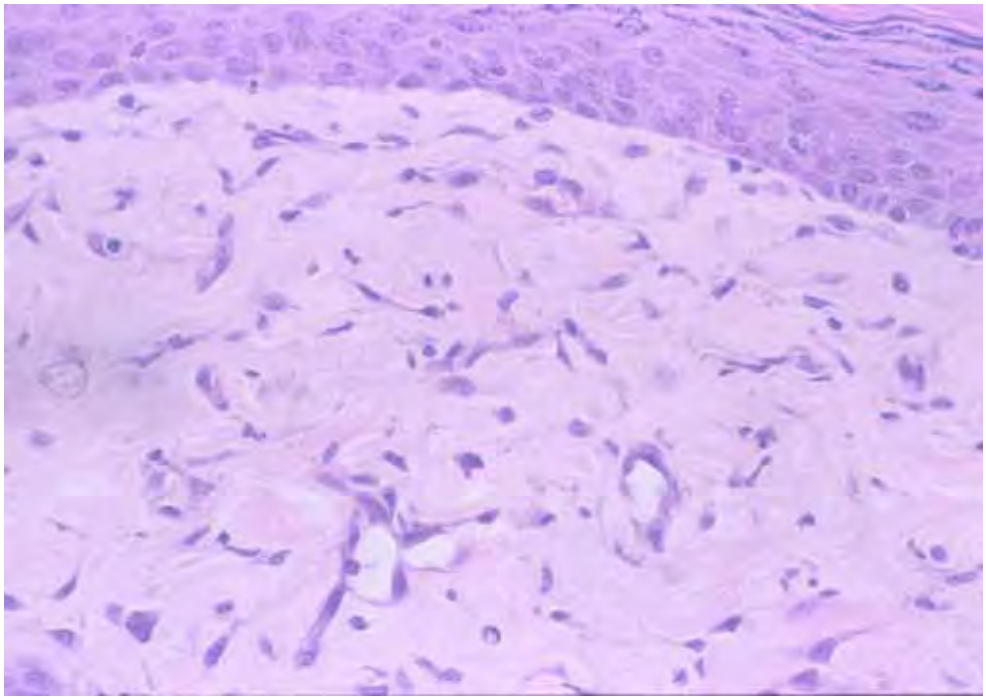


Figura 73 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração HE, tecido conjuntivo normal.

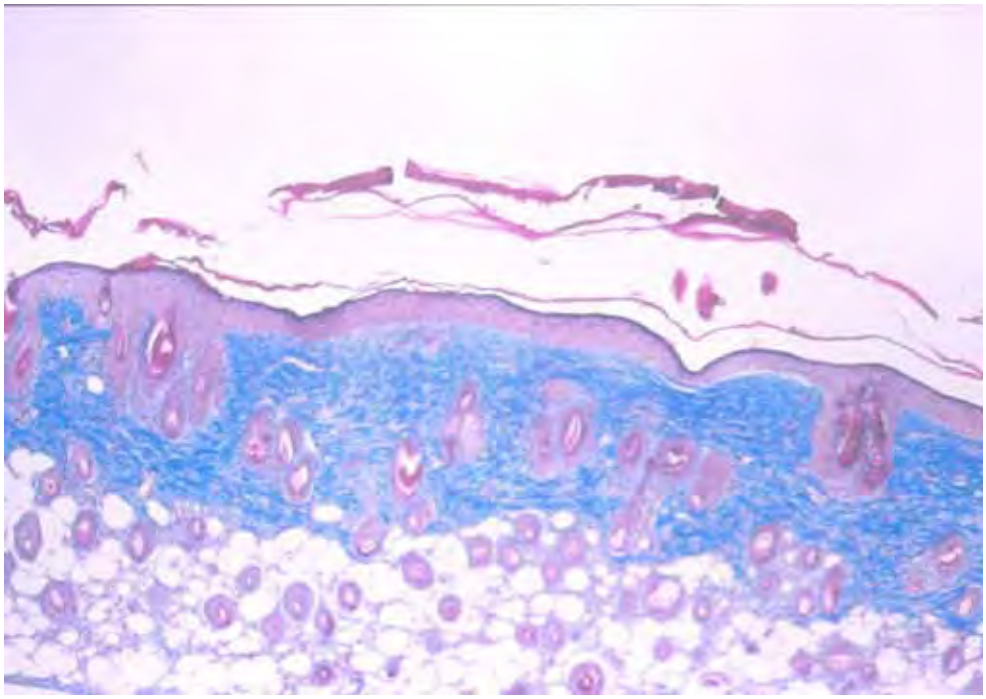


Figura 74 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral.

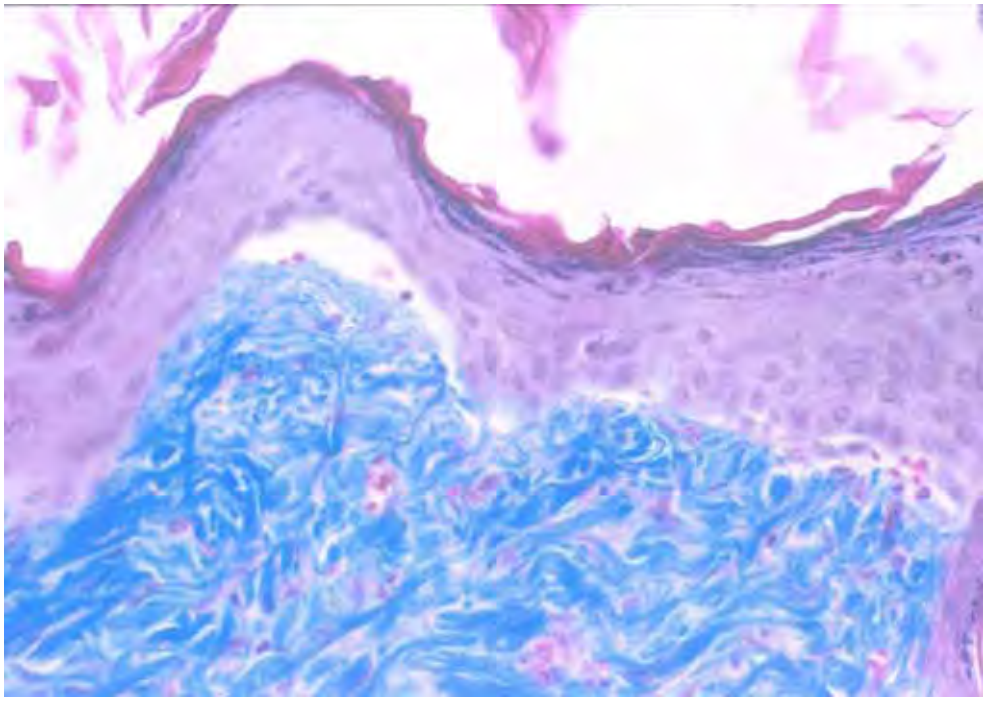


Figura 75 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio sem papilas conjuntivas.

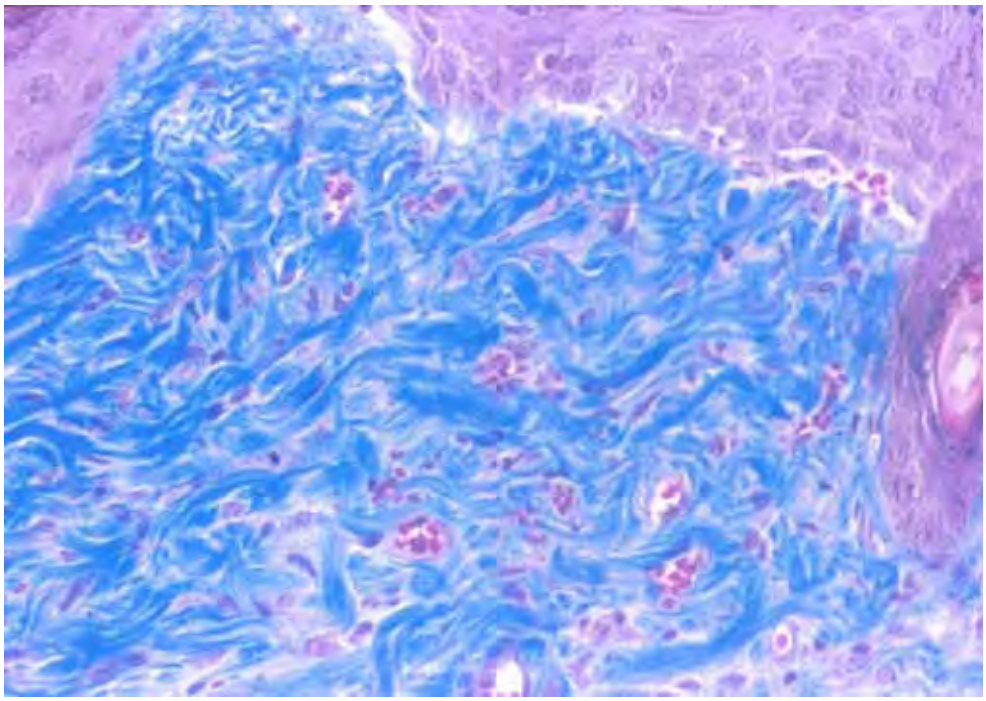


Figura 76 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 3º dia após a aplicação, coloração TM, derme com vasos hiperemiados.

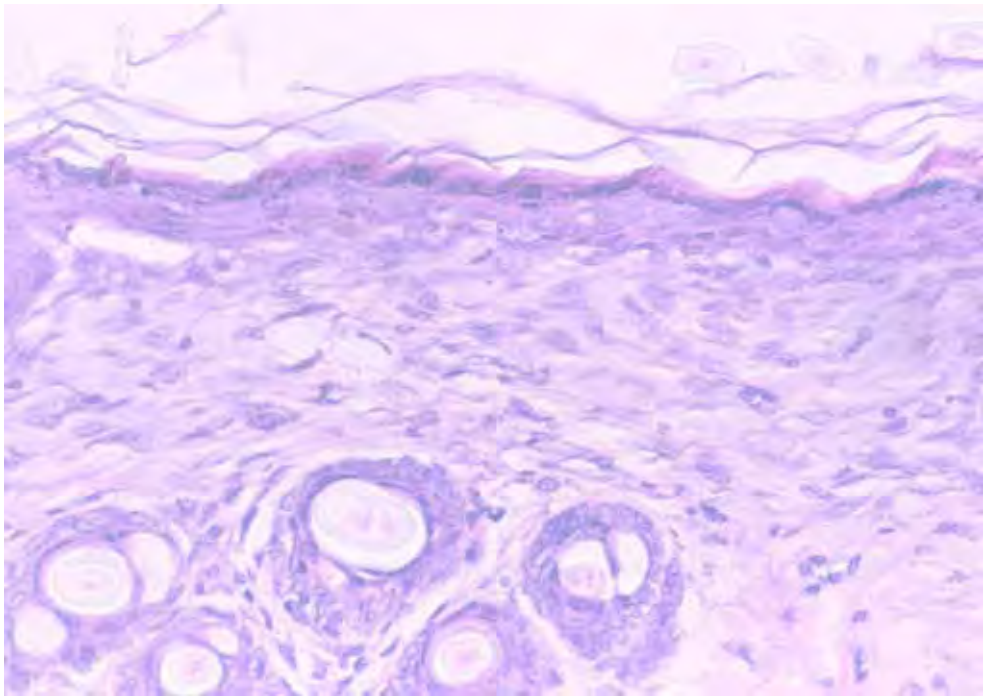


Figura 77 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 6º dia após a aplicação, coloração HE, epitélio fino com queratina.

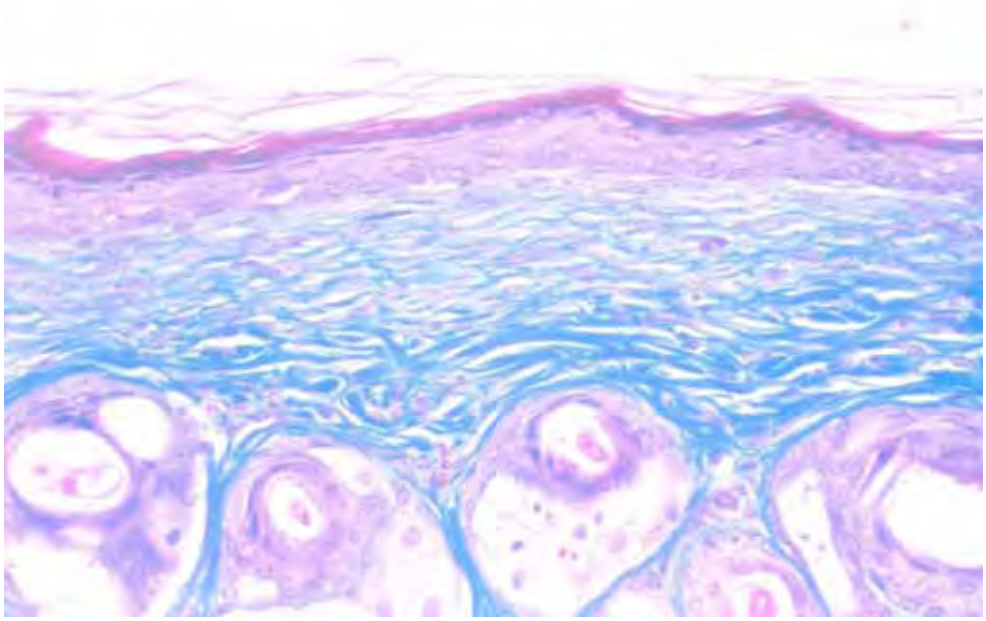


Figura 78 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 6º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio normal, fino, sem papilas conjuntivas.

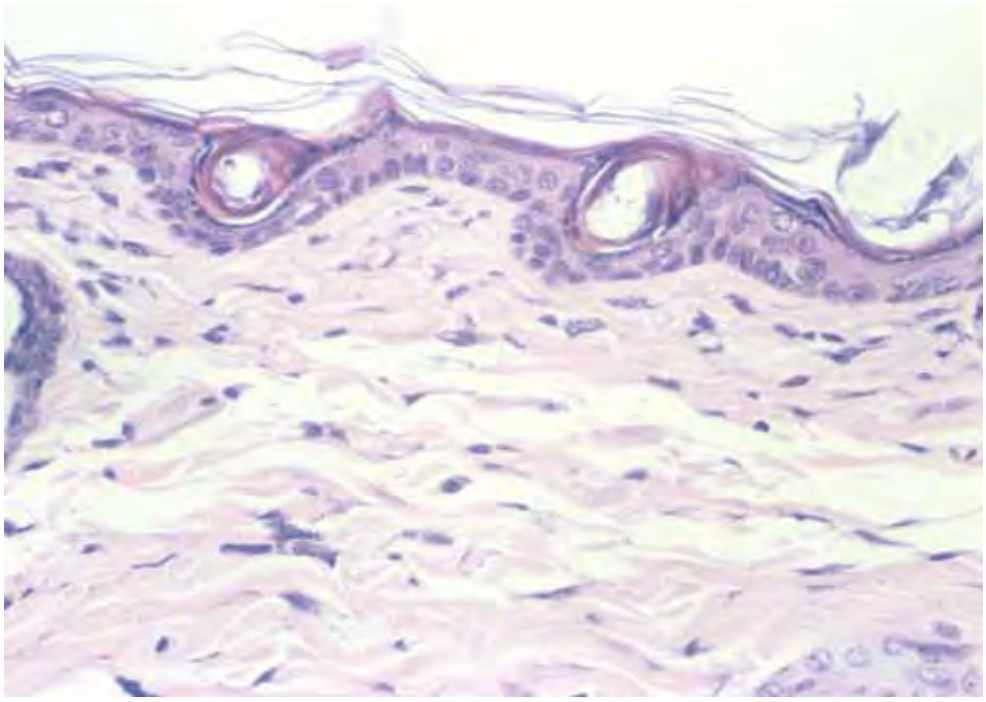


Figura 79 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 12º dia após a aplicação, coloração HE, epitélio fino com queratina.

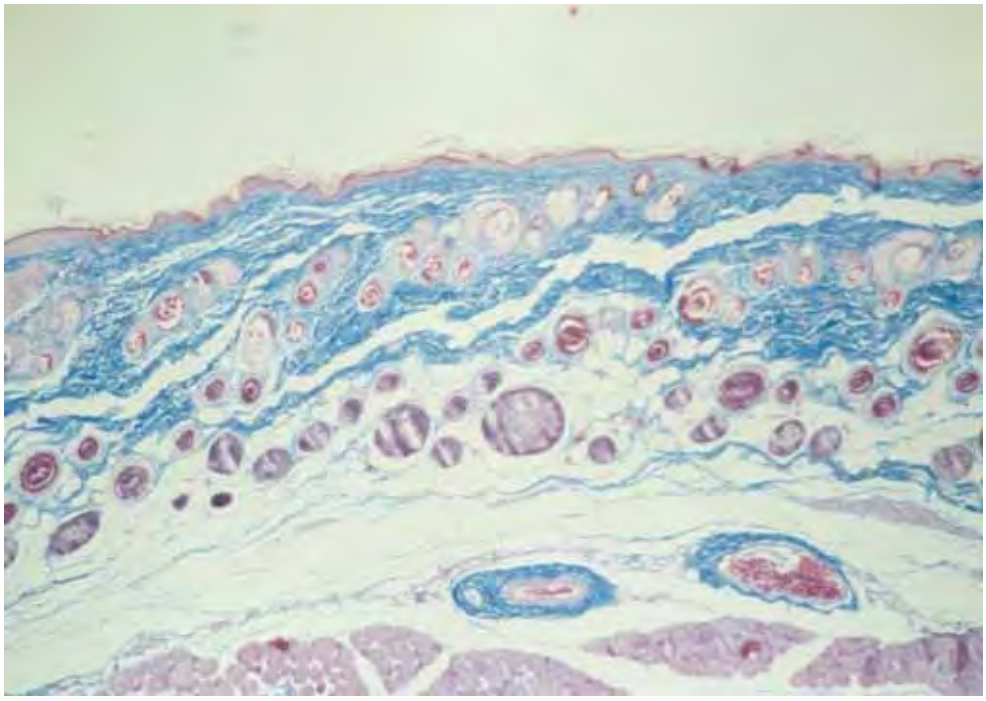


Figura 80 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 12º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio fino com queratina.

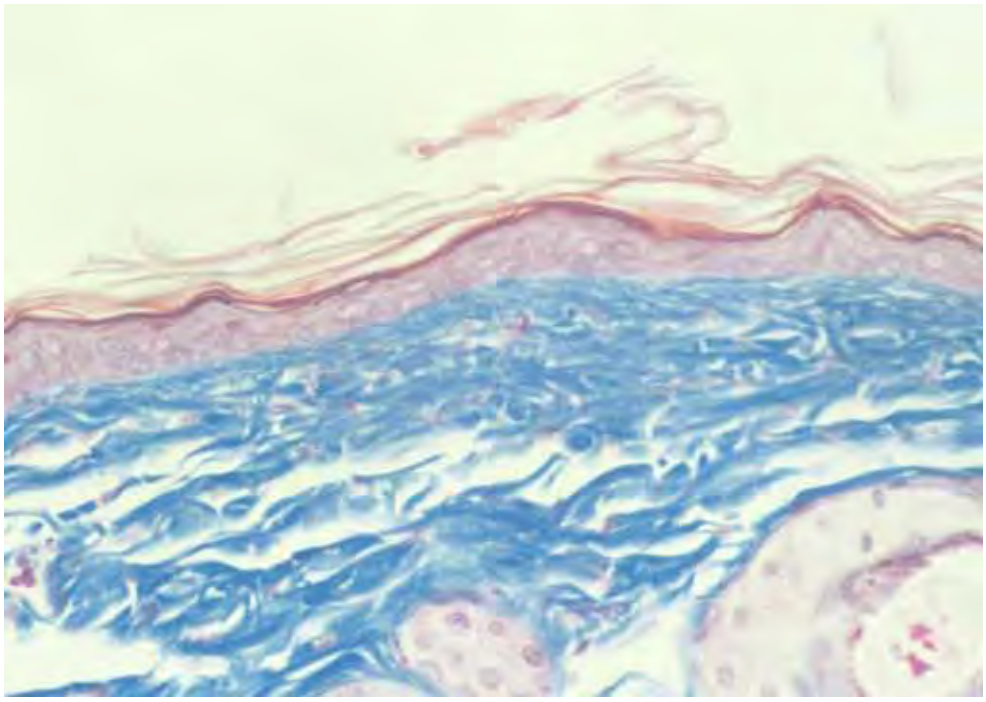


Figura 81 – Corte histológico do grupo 3 (ácido salicílico), 12º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio fino, fibras colágenas em feixes.

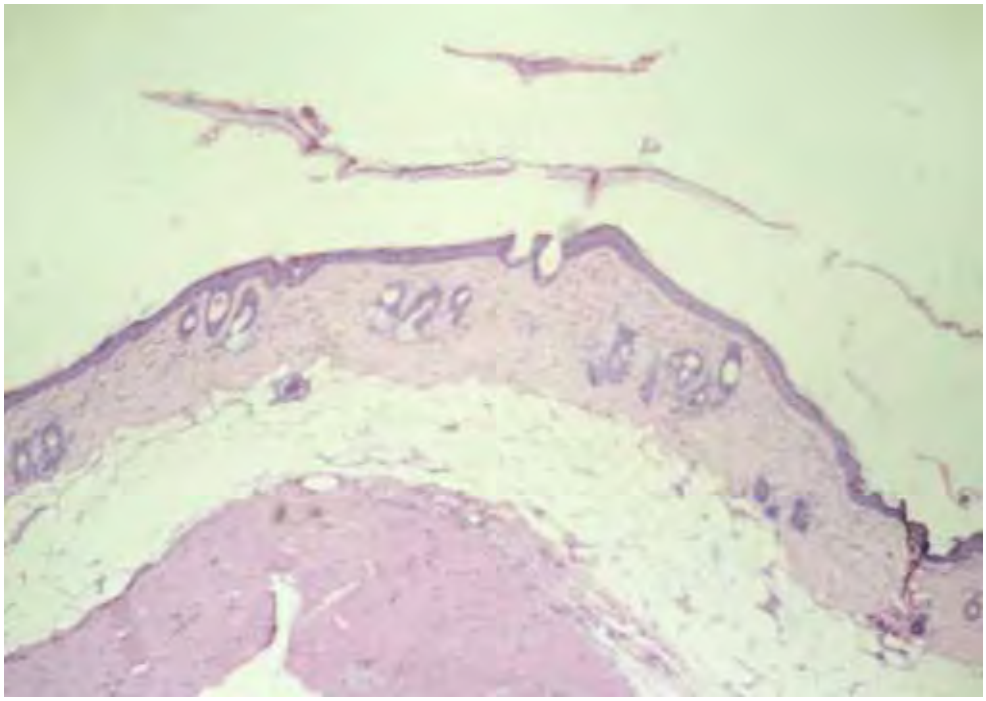


Figura 82 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 3º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral.

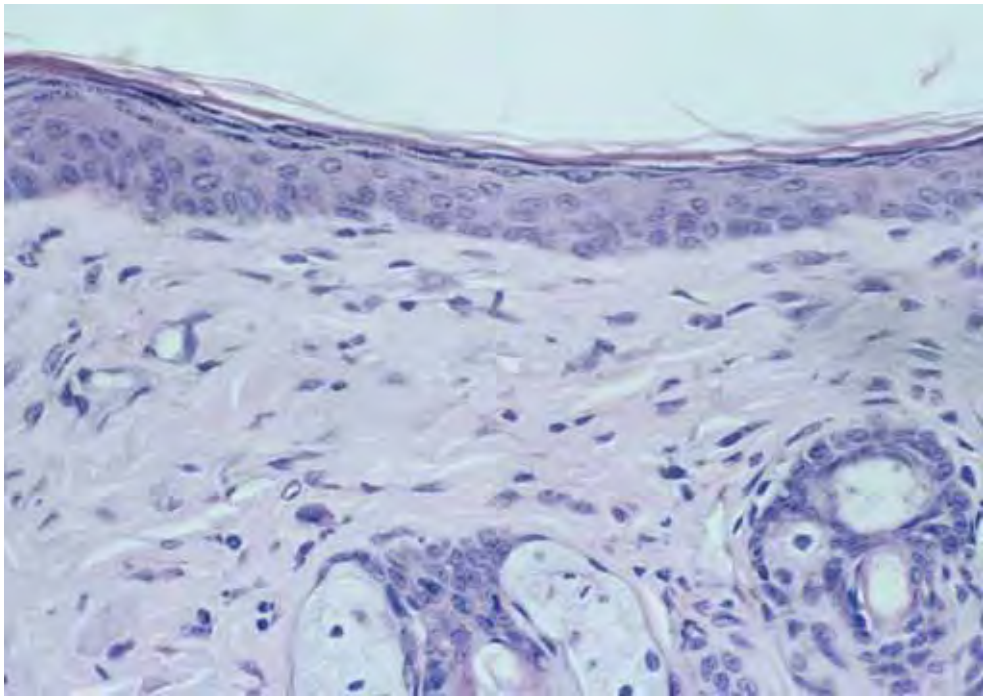


Figura 83 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 3º dia após a aplicação, coloração HE, visão geral.

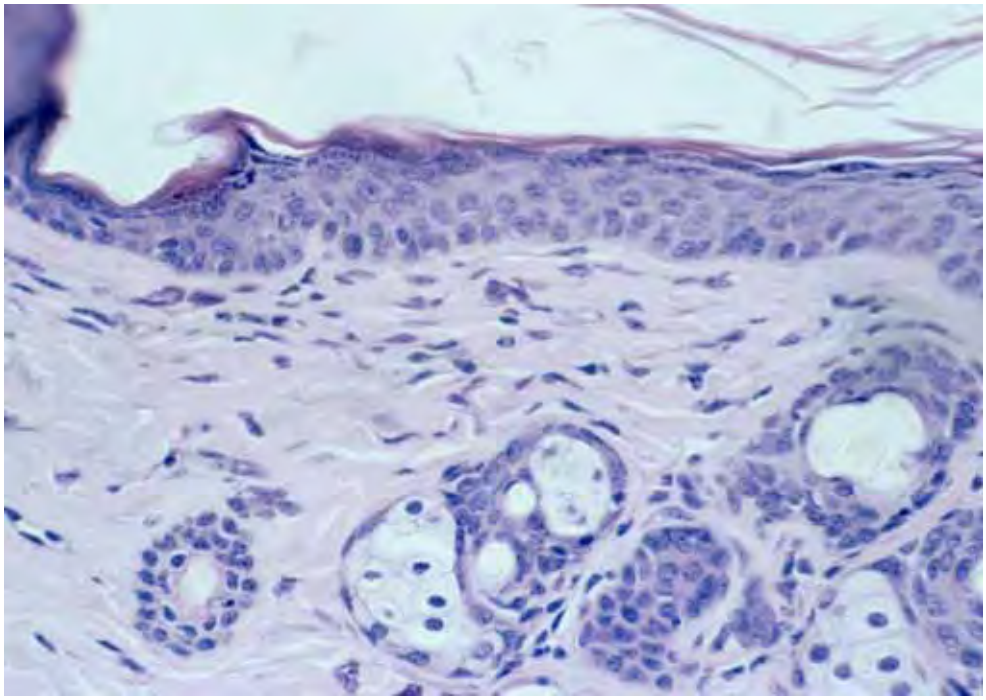


Figura 84 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 3º dia após a aplicação, coloração HE, derme com fibroblastos e macrófagos.

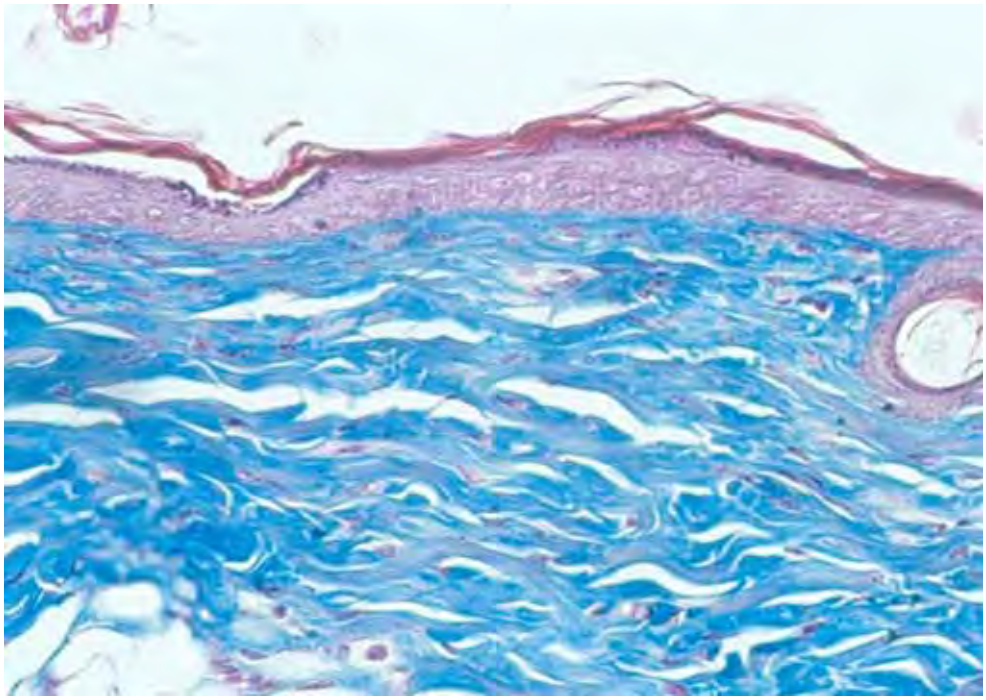


Figura 85 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 3º dia após a aplicação, coloração TM, interface derme/epiderme.

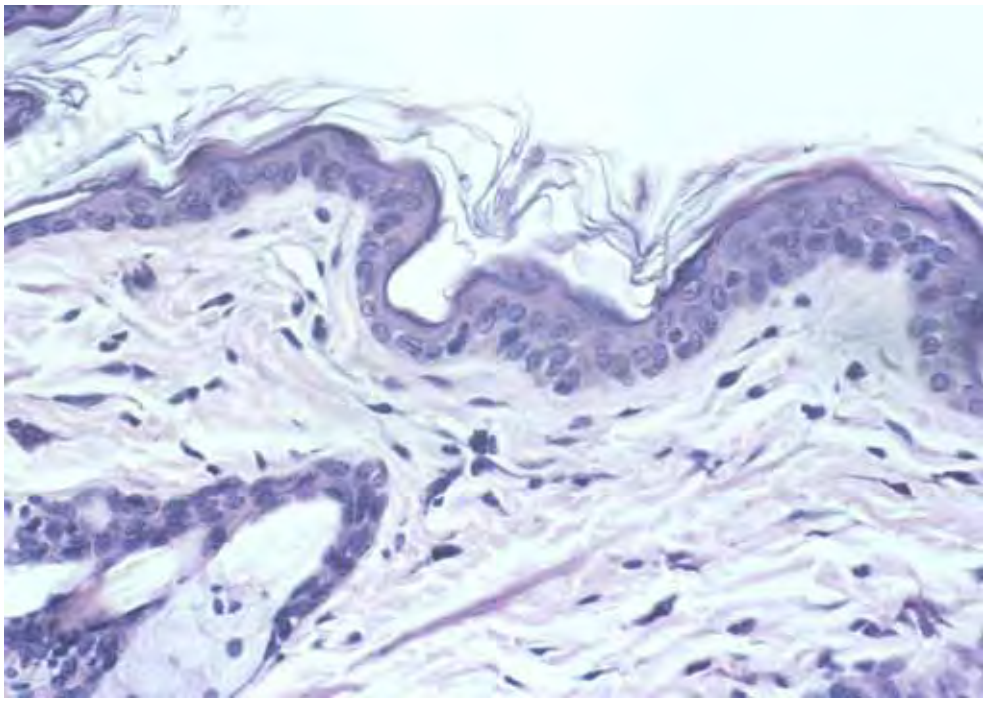


Figura 86 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 6º dia após a aplicação, coloração HE, papilas dérmicas e epitélio com queratina.

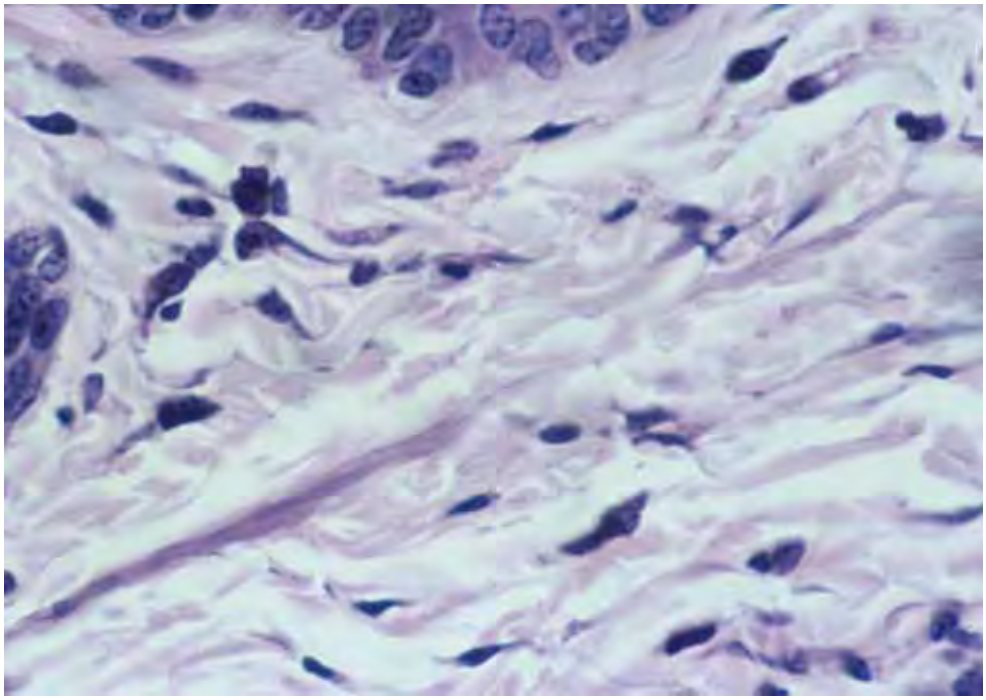


Figura 87 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 6º dia após a aplicação, coloração HE, macrófagos ativos na derme.

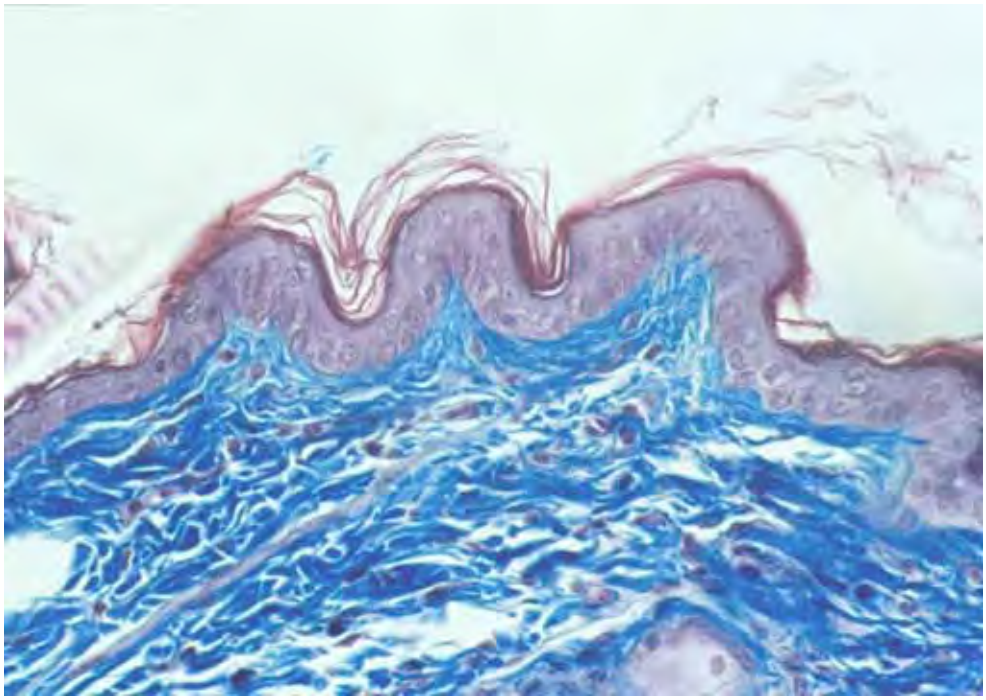


Figura 88 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 6º dia após a aplicação, coloração TM, epitélio com queratina e papilas conjuntivas.

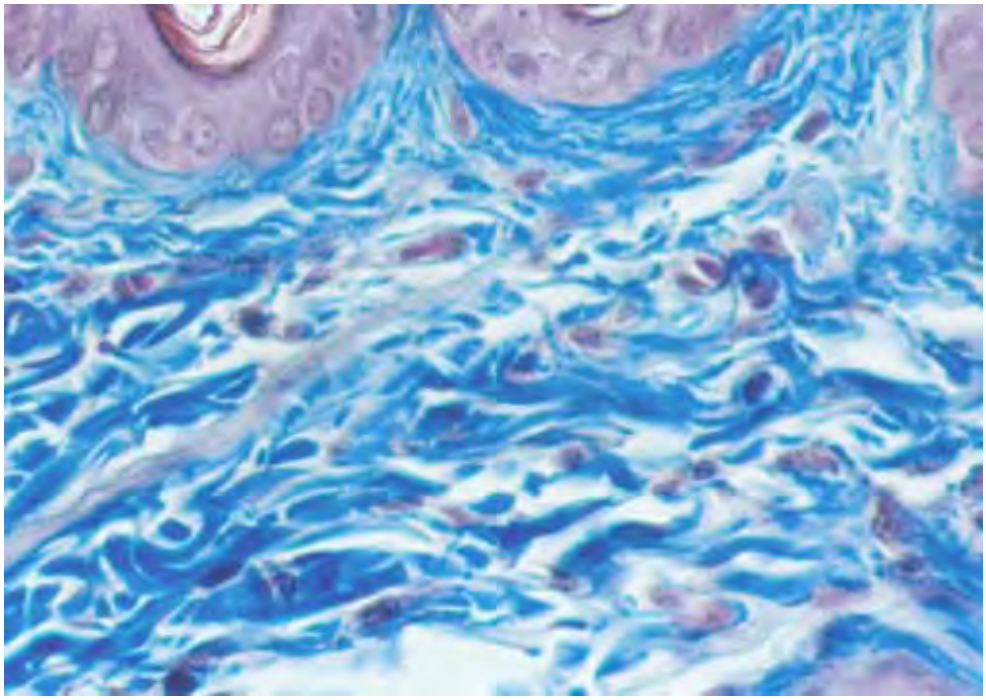


Figura 89 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 6º dia após a aplicação, coloração TM, feixes de colágenos e macrófagos ativos na derme.

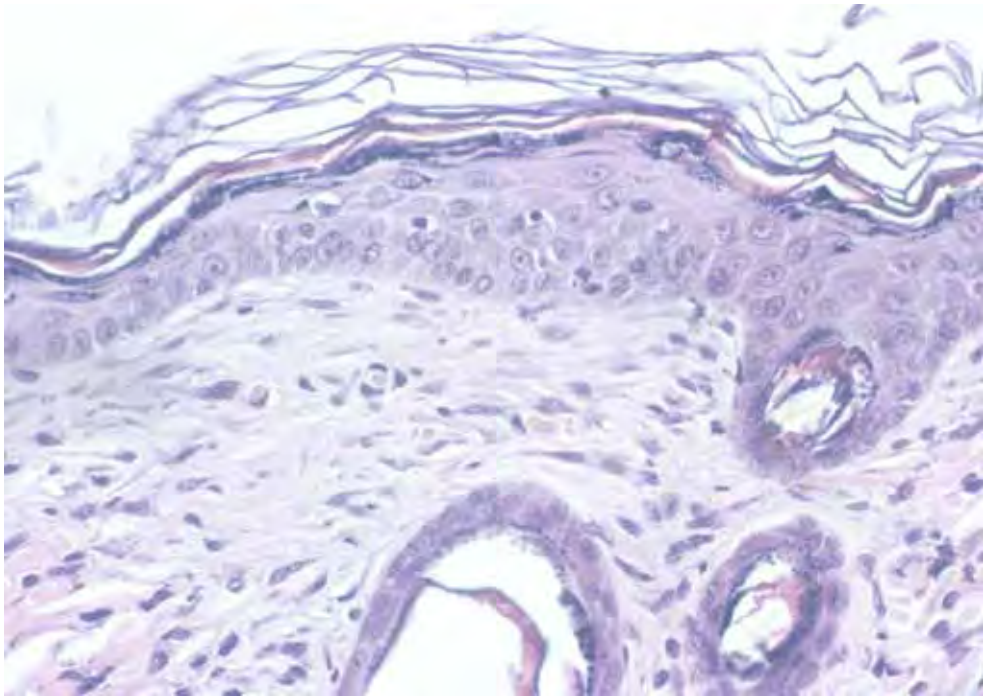


Figura 90 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 12º dia após a aplicação, coloração HE, papilas dérmicas e epitélio com queratina.

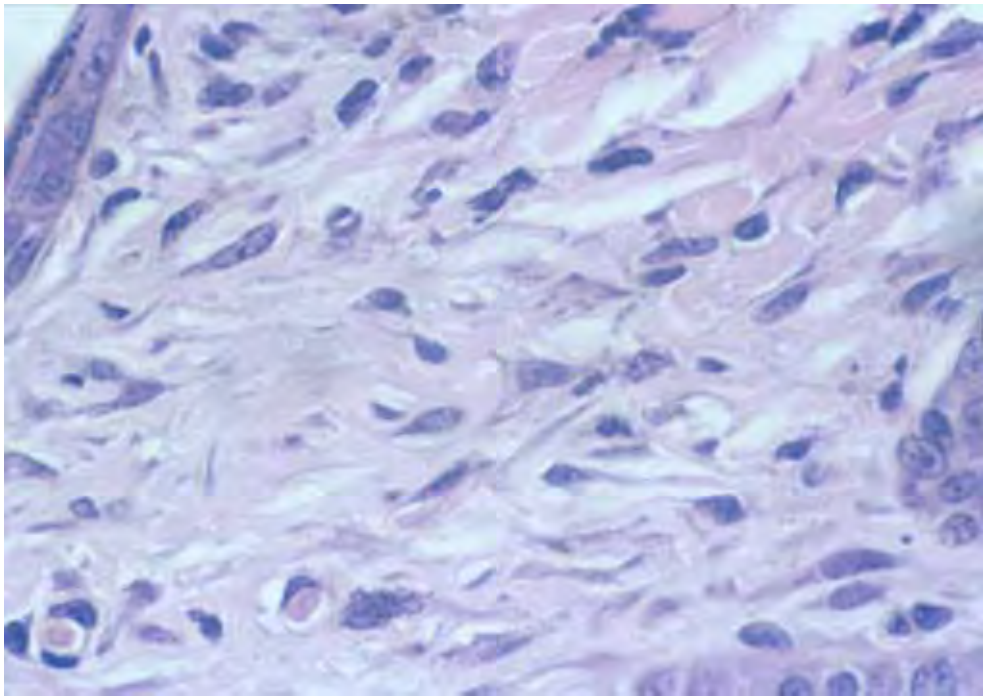


Figura 91 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 12º dia após a aplicação, coloração HE, derme com macrófagos ativos.

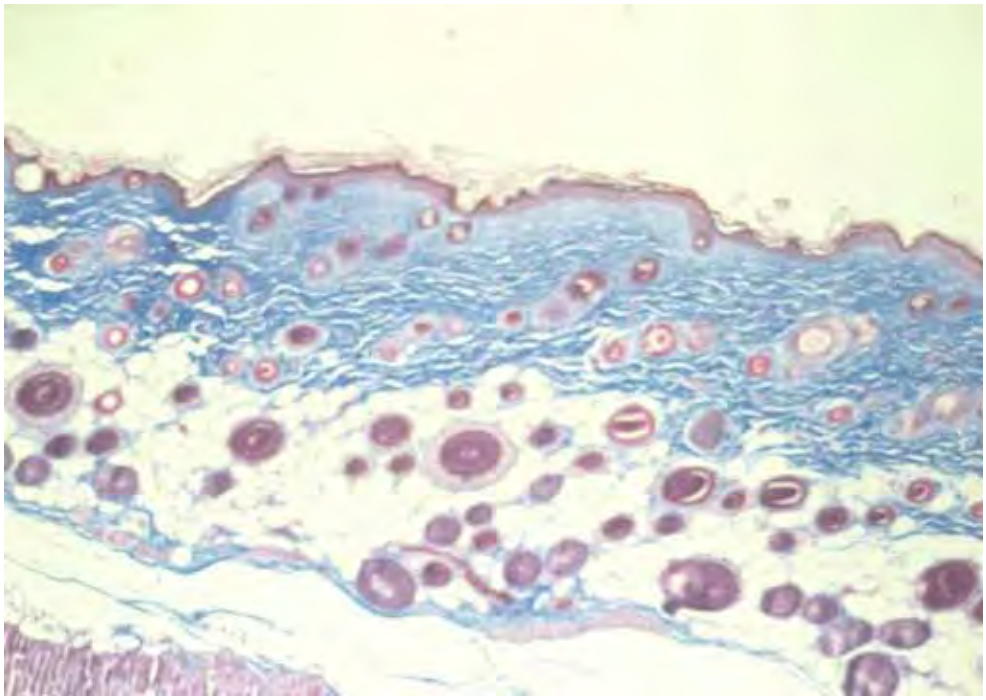


Figura 92 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 12º dia após a aplicação, coloração TM, visão geral.

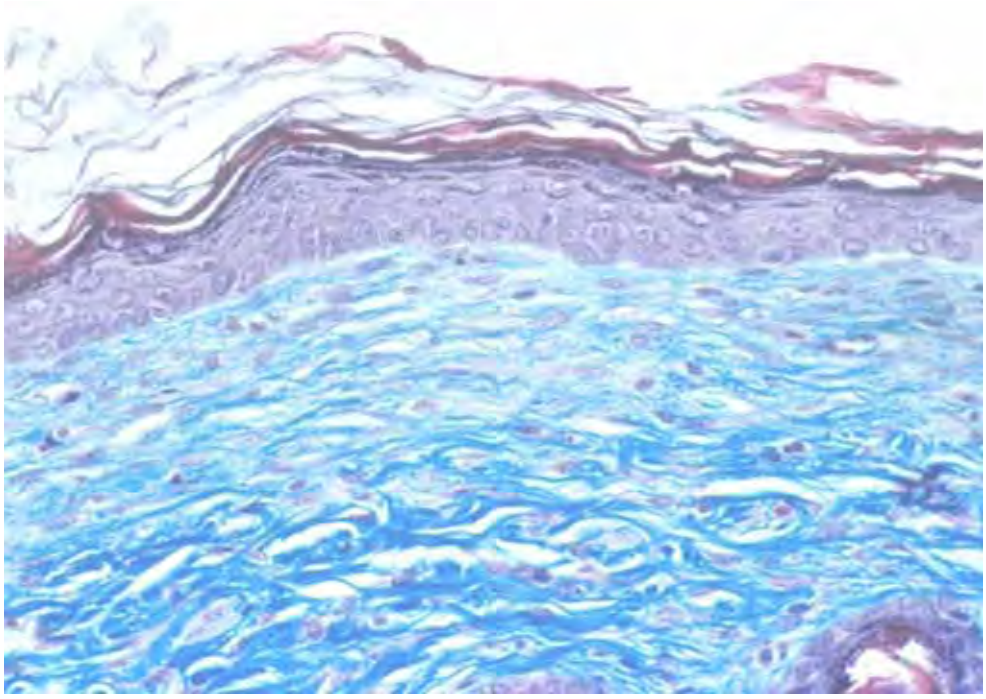


Figura 93 – Corte histológico do grupo 4 (nova formulação C), 12º dia após a aplicação, coloração TM, colágeno maduro e imaturo.

4.4.5. Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

A Tomografia por Coerência Óptica, OCT, ainda é uma técnica nova, principalmente no que se refere aos estudos de pele. Ainda, não existe nenhum estudo na literatura que relata o estudo de aplicações clínicas em tecidos específicos usando a técnica de imagem por reflexão. Com os resultados obtidos através desta técnica tentaremos comparar com os dados de histologia.

4.4.5.1.Controle

No corte controle (Figura 94) é possível visualizar a epiderme, em vermelho, ilesa e uniforme sobre o tecido conjuntivo da derme, em verde, abaixo do epitélio. Não é possível inferir, em qualquer período para qualquer um dos grupos, o que ocorre na derme, já que não há identificação de nenhuma estrutura ou características visíveis por esta técnica.

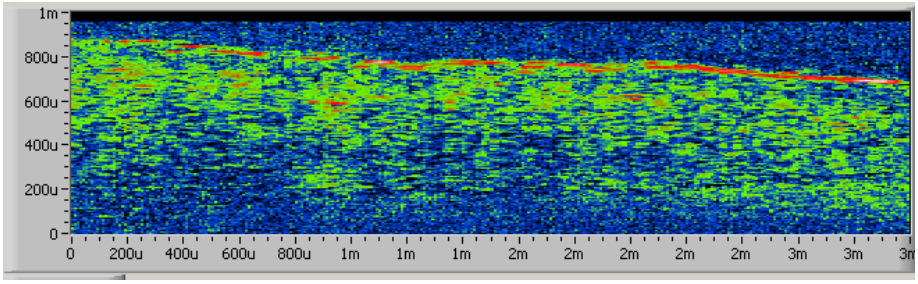


Figura 94 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo controle.

4.4.5.2. Amostra comercial

a) Dia 3

Ao terceiro dia após a aplicação da amostra comercial, é possível visualizar a crosta de material necrótico sobre o epitélio lesado, formando duas camadas nítidas, em vermelho e verde (Figura 95).

b) Dia 6

Ao sexto dia, ainda é possível observar a epiderme espessa devido à presença de material necrótico, e nota-se seu rompimento em alguns pontos, expondo a derme (Figura 95).

c) Dia 12

Neste período, nota-se que a epiderme ainda se apresenta rompida em alguns pontos, e ainda se apresenta mais espessa, possivelmente com material necrótico em sua superfície (Figua 95).

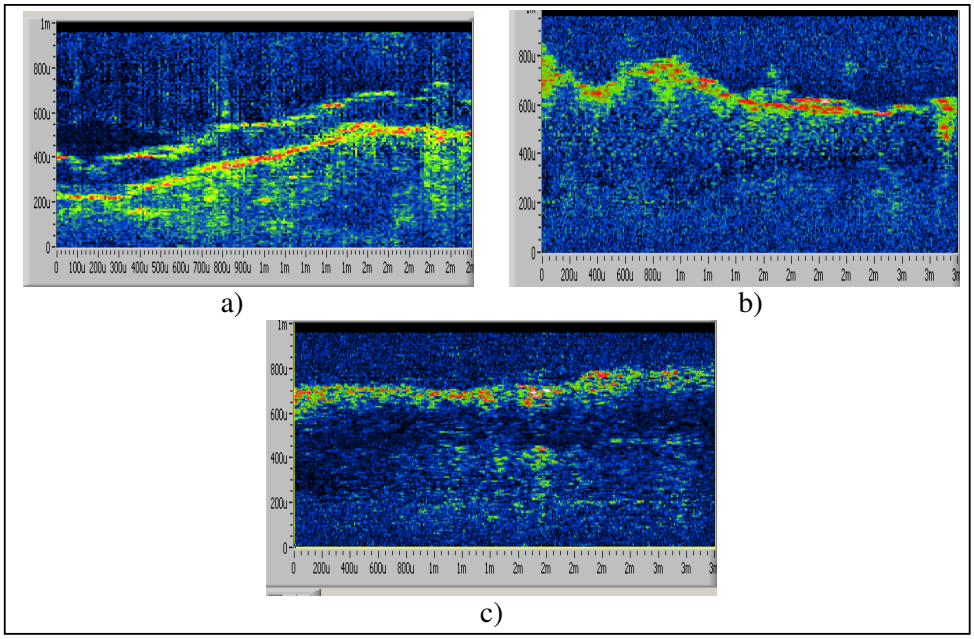


Figura 95 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo 1 (amostra comercial) a) 3º dia, b) 6º dia e, c) 12º dia após a aplicação.

4.4.5.3. Fenol

a) Dia 3

É possível observar o epitélio rompido, expondo o tecido conjuntivo da derme, e com pedaços da crosta de material necrótico sobre a epiderme lesada (Figura 96).

b) Dia 6

Ainda é possível notar a espessa camada de material necrótico na epiderme, e seu rompimento em inúmeros pontos (Figura 96).

c) Dia 12

O mesmo perfil do sexto dia é mantido ao décimo segundo dia, com rompimento da epiderme e exposição do tecido conjuntivo (Figura 96).

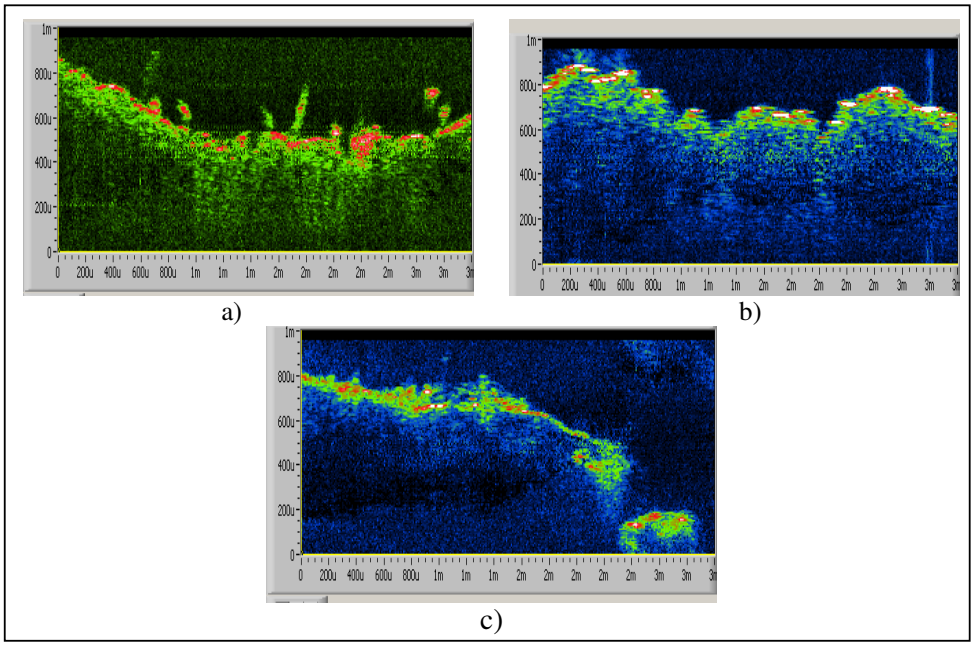


Figura 96 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo 2 (fenol),) a) 3º dia, b) 6º dia e, c) 12º dia após a aplicação.

4.4.5.4. Ácido salicílico

a) Dia 3

Neste período, pela imagem de OCT, não é possível notar alterações significativas no epitélio (Figura 97).

b) Dia 6

Neste período é possível visualizar a epiderme espessa e bem formada, mas aparentemente a espessura total da pele é inferior aos outros grupos (Figura 97).

c) Dia 12

Ao contrário da histologia, a imagem de OCT deste período mostra a epiderme espessa e bem formada, recobrindo a derme (Figura 97).

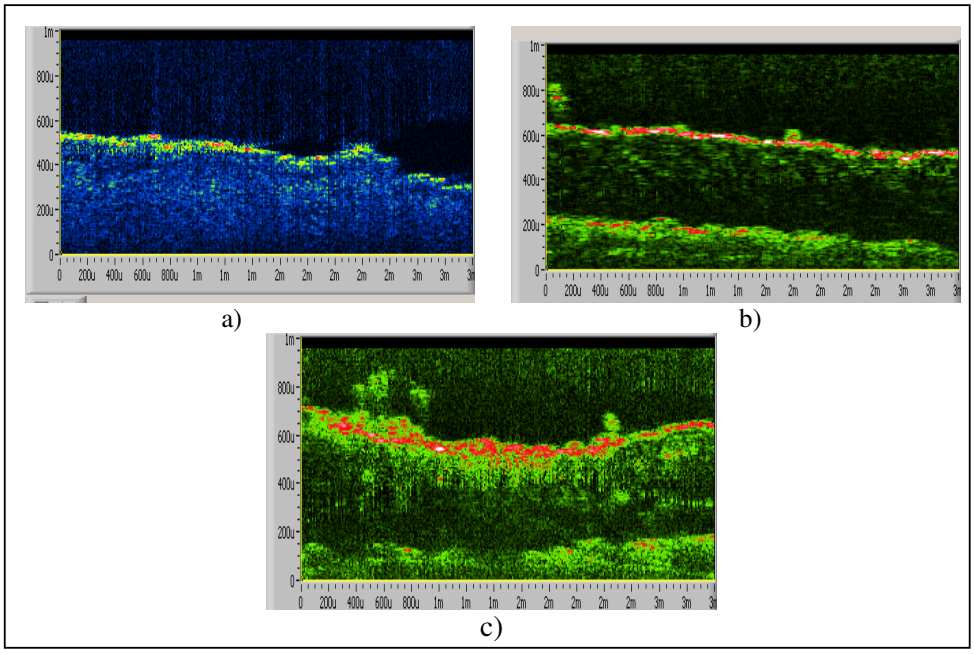


Figura 97 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo 3 (ácido salicílico), a) 3º dia, b) 6º dia e, c) 12º dia após a aplicação.

4.4.5.5. Proposta de nova formulação C

a) Dia 3

A camada superficial da pele se apresenta fina, mas sem sinais aparentes de lesão (Figura 98).

b) Dia 6

Neste período é possível observar que a espessura da epiderme aumentou com relação ao terceiro dia após a aplicação da proposta de nova formulação (Figura 98).

c) Dia 12

Novamente houve um aumento na espessura da epiderme, aumentando assim a camada protetora sobre o epitélio. Não se pode, contudo, fazer qualquer afirmação a respeito do ocorrente na derme, a não ser que provavelmente sua textura tenha sido intensificada, uma vez que houve também a intensificação da coloração nesta região (Figura 98).

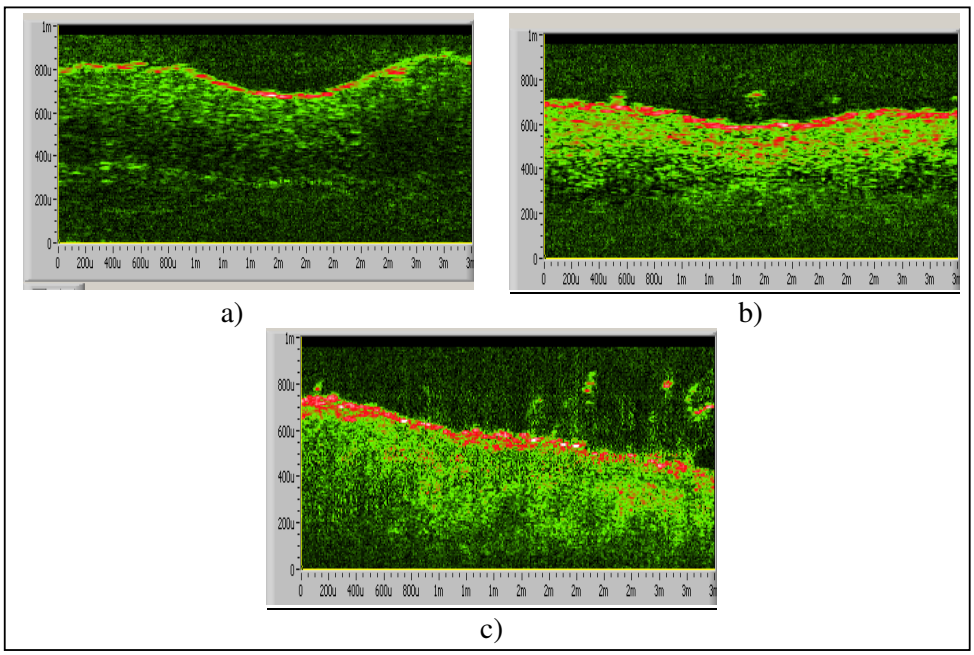


Figura 98 – Imagem de OCT do fragmento de pele dorsal de camundongo pertencente ao grupo 4 (proposta de nova formulação), a) 3º dia, b) 6º dia e, c) 12º dia após a aplicação.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em primeiro lugar, é importante ressaltar que o presente trabalho teve por principal objetivo abrir horizontes, estabelecer metas iniciais e servir de alicerce para que a partir deste momento outros estudos mais detalhados possam ser iniciados.

As análises iniciais para identificação e quantificação dos componentes da amostra comercial (Multipeel®) forneceram a composição de 50% de fenol e 13% de ácido salicílico em meio de etanol.

Durante o decorrer do trabalho foram avaliados 5 grupos experimentais em cada etapa: controle, amostra comercial, padrão de fenol, padrão de ácido salicílico e uma proposta de nova formulação.

- nova formulação A: amostra comercial adicionada de sílica microparticulada (SiO_2) (Aerosil®), com efeitos macroscópicos observados na primeira etapa (ensaios preliminares com camundongos (*Mus musculus)*).
- nova formulação B: amostra comercial adicionada de 10 % de polivinilpirrolidona (PVP K90®), com efeitos macroscópicos e toxicidade analisados mediante ensaios com coelhos (*Oryctolagus cunniculus*), na segunda etapa do trabalho.
- nova formulação C: 15% fenol, 6% ácido mandélico, 0,5% prilocaína em etanol. Esta formulação foi avaliada em termos macro e microscópicos em camundongos, na terceira etapa do trabalho.

Com relação à primeira etapa é possível concluir que o conhecimento das técnicas de manuseio foi adquirido e os grupos foram avaliados. Os grupos 1 (amostra comercial) e 2 (fenol) apresentaram efeito de *peeling* muito agressivo ao contrário do grupo 3 (ácido salicílico), que não apresentou efeito algum. Já para o grupo 4 (nova formulação A), observou-se que sua alta viscosidade proporcionou ação contrária à esperada, servindo como

máscara oclusiva, intensificando o efeito de *peeling* e sendo, portanto, descartada como possibilidade de nova formulação.

Na segunda etapa os grupos foram avaliados em termos de seus efeitos macroscópicos e sua toxicidade fornecendo resultado negativo de cardio, hepato e nefrotoxicidade para todos os grupos em todos os períodos estudados. Ainda foi possível descartar o grupo 4 (nova formulação B) como proposta de nova formulação, uma vez que, apesar de não ter apresentado efeitos tóxicos, mostrou intenso efeito de *peeling*, contrariando a idéia inicial de se obter uma formulação com efeito mais ameno.

A etapa seguinte do trabalho, novamente envolvendo o uso de camundongos, ficou subdividida em três partes cujos resultados foram avaliados conjuntamente.

Pela Espectrometria Raman foi possível delinear um perfil da razão das intensidades das bandas em 1657 e 1445cm^{-1}, absorções características de amida I (α-hélice) e deformação angular de CH_2, usada como padrão interno, respectivamente. Estes perfis confirmaram o rompimento das pontes dissulfeto da queratina, levando à sua perda de conformação α-hélice, mas não permitiram confirmar o mecanismo proposto completamente, uma vez que as espécies formadas hipoteticamente não foram detectadas.

Os resultados de FT-Raman foram confirmados pela Histologia, onde foi possível visualizar a nível celular, as etapas de inflamação, a profundidade da agressão e os efeitos do *peeling* em cada caso. Pela análise conjunta dos resultados pôde-se concluir que a formulação contendo apenas fenol (grupo 2), seguido pela amostra comercial, foi a mais agressiva aos animais, tendo efeitos drásticos a nível celular e comprovadamente a que levaria ao maior tempo necessário para restituição da pele.

A formulação que se mostrou mais adequada e forneceu resultados gratificantes foi a proposta de nova formulação C, utilizada nestes ensaios, mostrando sinais da ação do *peeling*,

logo no início do tratamento, com completa restituição da pele ainda no período observado e com efeito mais brando, atendendo à proposta incial.

Apesar de muito aplicável à biópsia óptica de tecidos biológicos, a técnica de OCT não se mostrou de valia para este estudo, uma vez que a pele, não sendo um tecido transparente, dificulta muito a penetração do laser no tecido e impossibilitando a formação de imagem nítida, indispensável para a identificação das estruturas, camadas e sub-camadas da epiderme e derme. Contudo, devido à escassez de informações nesta área na literatura, não se pode descartar estes resultados, servindo como início e base para o aperfeiçoamento desta técnica neste tipo de aplicação.

Como perspectivas deste trabalho é possível propor a realização de estudos menos complexos, mas mais aprofundados, tanto na área de FT-Raman, quanto de Histologia, uma vez que não se pôde realizar a análise estatística planejada para este estudo devido à perda de muitos animais durante o decorrer dos ensaios.

Podem-se realizar ensaios de longa duração para que os perfis dependentes do tempo, traçados a partir da técnica de FT-Raman, possam ser completados e uma análise pós-*peeling* seja realizada.

Para a confirmação definitiva do mecanismo de ação do fenol na pele, poder-se-ia utilizar a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) a fim de detectar se o mecanismo ocorre via radicalar e a própria espectrometria Raman a fim de detectar a formação de SH.

Deixa-se ainda como sugestão uma avaliação completa da nova formulação C que a princípio mostra-se adequada para o procedimento de *peeling*, mas necessita, entre outros, de estudos de toxicidade.

Quanto à técnica de OCT, propõe-se a mudança do comprimento de onda do laser utilizado, a fim de que a resolução da imagem seja melhorada podendo fornecer informações mais detalhadas do tecido em questão.

6. REFERÊNCIAS

ASOCIACIÓN ARGENTINA DE CLÍNICA ESTÉTICA. ***Peeling***. Disponível em: <www.esteticaclinica.org.ar/publicaciones/peeling.html>. Acesso em: 20 Jul. 2006.

BAKER, T. J.; GORDON, H. L.; STUZIN, J. M. Treatment of photoaging. Facial chemical peeling (phenol and trichloroacetic acid) and dermabrasion. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 20, n. 1, p. 9-25, 1993.

BARRY, B. W.; EDWARDS, H. G. M.; WILLIAMS, A. C. Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: assignment of spectral bands. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 23, p. 641-645, 1992.

BELL, G. H.; DAVIDSON, J. N.; SCARBOBOUGH, H. Protein metabolism. In: BELL, G. H.; DAVIDSON, J. N.; SCARBOBOUGH, H. **Textbook of physiology and biochemistry**. Edimburg: E & S Livingstone, 1959. cap. 23.

BRANDÃO, C. G.; FERREIRA, H. H. A.; PIOVESANA, H.; POLIMENO, N. C.; FERRAZ, J. G. P.; NUCCI, G. DE; PEDRAZZOLI JR., J. Development of an experimental model of liver cirrhosis in rabbits. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 987-990, 2000.

BUSH, B. M., **Interpretation of laboratory results for small animal clinicians**. Oxford: Blackwell Scientific, 1991.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. **Analyse du relief cutané**. Disponível em: <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/loupe_relief_cutane.html>. Acesso em: 05 Févr. 2006.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. **Épiderme, derme et hypoderme**. Disponível em: <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/derme.html>. Acesso em: 05 Févr. 2006.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. **Morphologie et contituants de la peau**. Disponível em: <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/morph.html>. Acesso em: 05 Févr. 2006.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. **Um tissu precieux**. Disponível em: <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/index.html>. Acesso em: 05 Févr. 2006.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. **Vieillissement de la peau**. Disponível em: <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/vieil.html>. Acesso em: 05 Févr. 2006.

CLÍNICA MEDICINA ESTÉTICA EM PORTO ALEGRE. ***Peeling* Químico**. Disponível em: <http://www.biomodulacaocorporal.com.br/peeling_quimico.htm>. Acesso em: 20 Jul. 2006.

COREY, C. L. **Facial chemical peels**. Disponível em: <www.bcm.edu/oto/grand/11_10_05.htm>. Acesso em: 20 July 2006.

CRAIG, A. M.; KARCHESY, J. J.; BLYTHE, L. L.; HERNÁNDEZ, M. P. G.; SWAN, L. R. Toxicity studies on western juniper oil (*Juniperus occidentalis*) and Port-Orford-cedar oil (*Chamaecyparis lawsoniana*) extracts utilizing local lymph node and acute dermal irritation assays. **Toxicology Letter*s***, v. 154, p. 217-224, 2004.

EDWARDS, H. G. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Potential applications of FT-Raman spectroscopy for dermatological diagnostics. **Journal of Molecular Structure**, v. 347, p. 379-388, 1995.

FARIA, D. L. A.; SOUZA, M. A. Raman spectra of human skin and nail excited in the visible region, **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 30, p. 169-171, 1999.

FERREIRA, P. G.; COSTA-E-SILVA, A.; MONTEIRO, E.; OLIVEIRA, M. J. R.; ÁGUAS, A. P. Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD). **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 393-401, 2006.

GELLA, J. Enzimologia Clínica. In: SASTRE, F. G. **Bioquímica Clínica**. Barcelona: Barcanova, 1994. p. 113-124.

GERSETICH, I.; TEOFOLL, P.; GANTCHEVA, M.; RIBUFFO, M.; PUDDU, P. Chemical peeling: how, when, why? **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 8, p. 1-11, 1997.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 291-299, 2004.

HORNBROOK, M. C.; DODD, R. Y.; JACOBS, P.; FRIEDMAN, L. I.; SHERMAN, K. E. Reducing the incidence of non-A, non-B post-transfusion hepatitis by testing donor blood for ALT: economic considerations. **New England Journal of Medicine**, v. 307, p. 1315-1321, 1982.

KACOWICS, J. **Método e processo para rejuvenescimento através de *peelings* profundo de fenol**. PI0503346-2, 10 Maio 2005.

KIMBER, I.; BASKETTER, D. A.; BERTHOLD, K.; BUTLER, M.; GARRIGUE, J. Skin sensitization testing in potency and risk assessment. **Toxicological Science**, v. 59, p. 198-208, 2001.

LAWRENCE, N.; MANDY, S.; YARBOROUGH, J.; ALT, T. History of dermabrasion. **Dermatologic Surgery**, v. 26, n. 2, p. 95-101, Feb. 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 839.

LEVIN, R. M.; LONGHURST, P. A.; LEVIN, S.; HAUGAARD, N.; WEIN, A. J. Creatine kinase activity of urinary bladder and skeletal muscle from control and steptozocin-diabetic rats. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 97, p. 153-159, 1990.

LOTT, A.; LANDERSMAN, P. The enzymology of skeletal muscle disorders. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Science**, v. 20, p. 153-190, 1984.

MENDELSOHN, J. E. Update on chemical peels. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 35, n. 1, p. 55-72, 2002.

MICHAL, G. Amino acids and derivatives. In: MICHAL, G. **Biochemical pathways:** an atlas of biochemistry and molecular biology. New York: John Wiley & Sons, 1999. cap. 4.

MICHAL, G. The cell and its contents. In: MICHAL, G. **Biochemical pathways:** an atlas of biochemistry and molecular biology. New York: John Wiley & Sons, 1999. cap. 2, p.19.

MORI, D. M. **Estudo de marcadores enzimáticos da rotina laboratorial no diabetes experimental.** 2002. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

MOSS, D. W.; HENDERSON, R. Enzymes. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz textbook of clinical chemistry**. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999. cap. 22, p. 617-721.

MURRAY, R. L. Alanine aminotransferase. In: PESCE, A. J.; KAPLAN, L. A. **Methods in Clinical Chemistry**. St. Louis: Mosby, 1987. cap. 141, p. 1093-1097.

MURRAY, R. L. Aspartate aminotransferase. In: PESCE, A. J.; KAPLAN, L. A. **Methods in Clinical Chemistry**. St. Louis: Mosby, 1987. cap. 136, p. 1062.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **2-hydroxy-benzoic acid**. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=SALICYLIC+ACID&Units=SI>. Acesso em: 23 Feb. 2006.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Phenol**. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C108952&Units=SI>. Acesso em: 23 Feb. 2006.

NAZIFI, S.; REZAKHANI, A.; BADRAN, M. Evaluation of hematological, serum biochemical and cerebrospinal fluid parameters in experimental bacterial meningitis in the calf. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 44, p. 55-63, 1997.

NEUMEIER, D. Tissue specific and sub cellular distribuition of CK isoenzymes. In: LENG, H. **CK isoenzymes**. Berlin: Springer Verlog, 1981.

OSWEILER, G. D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: ArtMed, 1998, p.526.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle biológico de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 309.

PRICE, N. C.; STEVENS, L. **Fundamentals of enzimology**. 3rd. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

REG, R. Aspartate aminotransferase activity and isoenzyme proportions in human liver tissues. **Clinical Chemistry**, v. 24, p. 1971-1979, 1978.

REG, R. Aspartate aminotransferase. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Science**, v. 21, p. 99-186, 1984.

ROBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1971.

RUBIN, M.G. Trichloroacetic acid and other non-phenol peels, **Clinics in Plastic Surgery**, v. 19, n. 2, p. 525-536, 1992.

SACHER, R. A.; McPHERSON, R. A. General chemistry. In: SACHER, R. A.; McPHERSON, R. A. **Widmann´s clinical interpretation of laboratory tests**. 10. ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 1991. cap. 9.

SACHER, R. A.; McPHERSON, R. A. Enzymes useful in clinical chemistry diagnosis. In: SACHER, R. A.; McPHERSON, R. A. **Widmann´s clinical interpretation of laboratory tests**. 10. ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 1991. cap. 11.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Espectrometria de massas. In: SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1998.

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F. X. Espectrometria de ^{13}C-RMN. In: SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1998.

SIMONSEN, L.; PETERSEN, M. B.; GROTH, L. In vivo skin penetration of salicylic compounds in hairless rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, p. 95-104, 2002.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.

U. S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE and NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Medical ecyclopedia:** creatinina-serum. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003475.htm>. Acesso em: 25 July 2006.

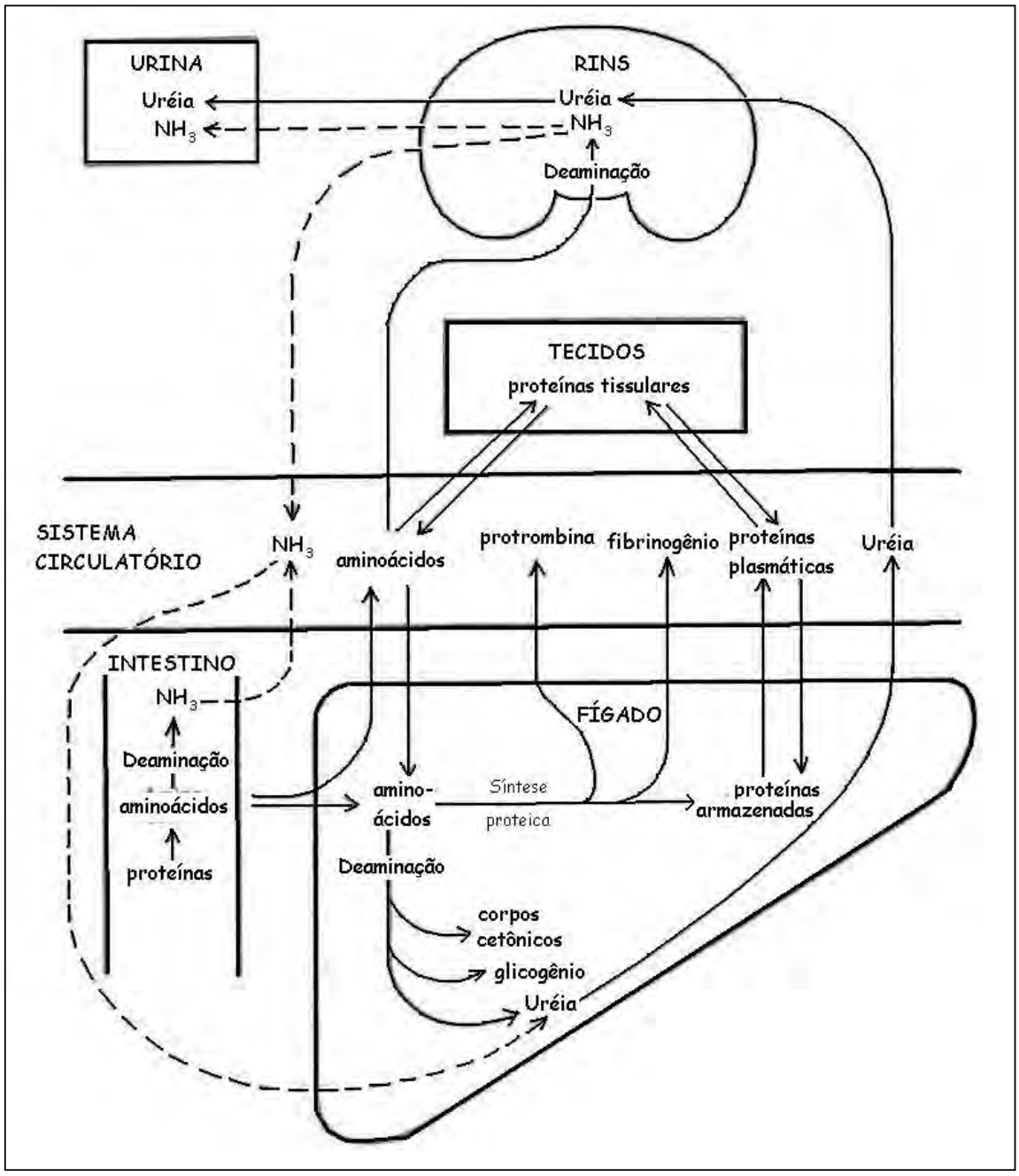
U. S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE and NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Medical ecyclopedia:** urine. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003610.htm>. Acesso em: 25 July 2006.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2000. cap. 11, p. 283.

WALLACH, J. Exames específicos de laboratório. In: WALLACH, J. **Interpretação de diagnósticos de laboratório**. São Paulo: Manole, 1976. parte II.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W.; EDWARDS, H. G. M. Raman spectra of human keratotic biopolymers: skin, callus, hair and nail. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 25, p. 95-98, 1994.

Anexo A – Metabolismo de proteínas e produção de uréia no fígado. (As linhas pontilhadas mostram caminhos percorridos por NH_3).



Fonte: Adaptado de BELL, 1959.