

Desenvolvimento de um Modelo Experimental In Vivo para Avaliação da Capacidade Protectora e/ou Reparadora de Formulações Tópicas Utilizadas na Prevenção e Tratamento da Ferida Cutânea

Development of an Experimental In Vivo Model for the Evaluation of the Protective and/or Repairing Capacity of Topical Formulations Used in the Prevention and Treatment of the Cutaneous Wound

Pedro C. Pinto¹, Luís M. Rodrigues²

¹ Unid. Dermatologia Experimental DCS, Universidade Lusófona (ULHT), Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa PORTUGAL

² Lab. Fisiologia Experimental (UCTF) Universidade de Lisboa Fac. Farmácia, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa PORTUGAL

Resumo

A utilização de substâncias tópicas na prevenção e tratamento da ferida cutânea impõem a existência de métodos *in vivo* que permitam estudar a capacidade protectora e reparadora destas formulações. O objectivo deste trabalho centra-se na definição de critérios experimentais que possibilitem concretizar cientificamente estes efeitos utilizando um micrométodo de lesão com Lauril Sulfato de Sódio (LSS). Estudaram-se duas formulações contendo Óxido de Zinco e Vitamina A em formas galénicas diferentes (spray e pomada), avaliando-se a capacidade de reparação e capacidade de protecção através da medição da Perda Trans-Epidérmica de Água (PTEA) e do grau de Eritema em 30 voluntários saudáveis. Definiram-se como critérios experimentais relevantes o tempo de recuperação da pele, a comparação com o controlo num *end point* estatístico e a correlação entre as variáveis medidas. A indução da lesão cutânea foi realizada através da aplicação de LSS a 1% durante 24H. O modelo experimental apresentado e os critérios propostos foram adequados para descrever a capacidade protectora e reparadora das formulações. Adicionalmente demonstrou-se o interesse de formulações contendo associações de Óxido de Zinco e Vitamina A na protecção e reparação da lesão cutânea.

Palavras chave: Lauril Sulfato de Sódio, PTEA, Lesão cutânea, Modelos experimentais

Abstract:

The use of topical substances for the prevention and treatment of the cutaneous wound imposes the existence of *in vivo* methods enabling the study of the protective and repairing capacity of these formulations. The purpose of this work is centered on the definition of experimental criteria that makes it possible to render these effects scientifically using a lesion micromethod with Sodium Lauryl Sulfate (SLS). Two formulations containing Zinc Oxide and Vitamin A in different galenic forms (spray and ointment), were studied, for their repairing and protective capacities expressed by the Trans Epidermal Water Loss (TEWL) and erythema in 30 healthy volunteers. The induction of the cutaneous lesion was accomplished through the application of 1% SLS during 24H. The defined relevant experimental criteria were the time of recovery of the skin, the comparison with a control in a statistical end point and the correlation between the measured variables. Results demonstrated that the presented experimental model and related criteria were appropriate to describe the protective and repairing capacity of the formulations. Additionally the interest of formulations containing associations of Zinc Oxide and Vitamin A were demonstrated in both protection and repairing of the *in vivo* cutaneous lesion.

Key words: Sodium Lauryl Sulfate, TEWL, cutaneous lesion, experimental models

Recebido em 12/10/2005
Aceite em 06/03/2006

Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2006; (3) 1: 53-62
Versão electrónica: <http://revistasaude.ulusofona.pt>

Introdução

A alteração da integridade cutânea apresenta múltiplas expressões com diferentes gravidades, envolvendo em qualquer caso intenso desconforto e alteração da qualidade de vida. São exemplos claros aquelas resultantes de processos irritativos (dermatite das fraldas, por exemplo) bem como, em outro contexto fisiopatológico, as úlceras (arteriais ou venosas, entre outras) e perdas totais ou parciais da pele por trauma. Estima-se que estes problemas afectem cerca de 1,5% da população, representando por isso um sério problema clínico e social^[1].

Os complexos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na recuperação da ferida cutânea têm constituído um motivo central de interesse para diversos grupos de investigação, focando os mais diversos aspectos deste complexo processo^[2-4]. Neste contexto, o desenvolvimento de modelos e "micrométodos" de estudo da lesão cutânea, em animal^[5,6] ou em humanos^[7,8] têm sido da maior importância.

Actualmente, os principais modelos de estudo da lesão cutânea in vivo envolvem:

- modelos de lesão mecânica produzida através de *tape stripping*, permitindo estudar a velocidade de recuperação da barreira^[9,10] ou por excisão parcial de pele, mais frequentemente utilizados no estudo de materiais de penso ou de substâncias de revestimento;
- modelos de lesão química, produzida através de solventes lipídicos como a Acetona ou o Tolueno, ou através de substâncias como o Hidróxido de Sódio, o Ácido Láctico ou o Lauril Sulfato de Sódio (LSS) capazes de produzir lesões de grau diferente consoante a concentração de agente indutor utilizado^[11-13].

Outros modelos podem ser desenvolvidos visando o estudo de processos particulares, como é o caso dos que abordam os mecanismos de alergia ou intolerância a agentes específicos, ou para o estudo de efeitos terapêuticos especiais in vivo^[9];

Os modelos de lesão com LSS (em concentrações entre 0,25% e 10%) têm sido amplamente utilizados neste âmbito, produzindo uma vasta informação sobre a dermatotoxicidade deste composto na pele humana, bem como dos mecanismos envolvidos nas alterações de integridade da pele assim induzidas^[9,14-17] parecendo, por isso, adequado a outros desenvolvimentos.

O presente estudo visa contribuir para a definição de critérios experimentais que possibilitem objectivar os efeitos de "protecção" e "reparação" tão frequentemente referenciados em formulações tópicas utilizadas para estes fins nas mais diversas especialidades e situações clínicas, utilizando um micrométodo químico com LSS.

Introduction

Cutaneous integrity modifications have multiple expressions with different degrees of severity, involving in all cases intense discomfort and a change of the quality of life. Clear examples are those resulting from irritative processes (dermatitis from diapers, for instance) as well as, in another pathophysiological context, ulcers (arterial or veined, among others) and total or partial loss of the skin due to trauma. It is estimated that these problems may affect about 1,5% of the population being therefore, a serious clinical and social problem^[1].

The complex pathophysiological mechanisms involved in the recovery of the cutaneous wound are a central reason of interest for several investigation groups, focusing on various aspects of this complex process^[2-4]. Thus, the development of study models and "micromethods" of the cutaneous lesion, in animals^[5,6] or in humans^[7,8] have been of primary importance.

Nowadays, the main models of study of cutaneous lesion in vivo involve:

- models of mechanical lesion produced by tape stripping, allowing for the study of the speed of recovery of the barrier^[9,10] or by partial excision of the skin, more frequently used in the study of **cleaning?** materials or covering substances;
- models of chemical lesion, produced by lipidic solvents such as Acetone or Toluene, or by substances such as Sodium Hydroxide, Lactic Acid or Sodium Lauril Sulfate (SLS) capable of producing lesions of a different degree related to the inductor agent concentration^[11-13].

Other models can be developed seeking the study of specific cases, as it is the case of the ones that approach the allergy mechanisms or intolerance to specific agents, or the study of special therapeutic effects in vivo^[9];

Lesion models with SLS (in concentrations between 0,25% and 10%) have been used thoroughly in this context, producing a vast information on the dermal toxicity of this molecule in the human skin, as well as the mechanisms involved in the changes of skin integrity^[9,14-17], seeming, in that way, appropriate for other developments.

The present study seeks to contribute to the definition of experimental criteria that so frequently makes it possible to quantify the "protection" and "repairing" effects referenced in topical formulations used for these purposes in the most varied specialties and clinical situations, using a chemical micromethod with SLS.

Material e métodos

O estudo foi realizado em 30 voluntários saudáveis (homens e mulheres) com idades compreendidas entre os 18 e os 65 anos ($21,9 \pm 6,2$) seleccionados após consentimento informado. Os protocolos experimentais do estudo, bem como os formulários de informação e de consentimento informado foram previamente submetidos e avaliados pela Comissão de Ética do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Lusófona. Todas as metodologias realizadas encontram-se de acordo com os princípios gerais das Boas Práticas Clínicas^[18-21].

Formulações

Foram escolhidas para estudo duas formulações comercialmente disponíveis, referenciadas para os efeitos em estudo (Halibut Derma® Spray e Halibut® Pomada, Laboratórios Grunenthal, Portugal) (Tabela I). Formulações tópicas com elevadas relações de óxido de zinco (ZnO) - Vitamina A (Vit.A) são frequentemente apontadas como eficazes na prevenção e tratamento da lesão cutânea de diferentes gravidades pese embora a insuficiência de uma sustentação técnica e científica adequada^[22-24].

Material and methods

The study was accomplished in 30 healthy volunteers (men and women) between the ages of 18 and 65 ($21,9 \pm 6,2$) who were selected after informed consent. The experimental protocols of the study, as well as the information forms and the informed consent were previously submitted and evaluated by the Ethics Commission of the Health Sciences Department of Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. All of the accomplished methodologies are in agreement with the general principles of the Good Clinical Practices^[18-21].

Formulations

Two formulations commercially available were chosen for this study, referenced for their effects in studies (Halibut Derma® Spray and Halibut® Pomada, Laboratórios Grunenthal, Portugal) (table I). Topical formulations with high associations of Zinc Oxide (ZnO) - Vitamin A (Vit. A) are frequently pointed out as being effective in the prevention and treatment of the cutaneous lesion of different degrees notwithstanding the inadequacy of a technical and scientific substantiation^[22-24].

Tabela I Características galénicas e relação ZnO/Vitamina A das formulações testadas
Table I Galenic characteristics and relation ZnO/Vitamin A of the tested formulations

	Formulação A (Formulation A) (Halibut Derma® Spray)	Formulação B (Formulation B) (Halibut® Pomada)
Forma galénica (Galenic form)	Spray	Pomada (Ointment)
Relação ZnO/Vit. A (Relation ZnO/Vit. A)	1/63	1/45

Protocolo experimental

O agente mimetizador da lesão cutânea foi o LSS (solução aquosa a 1%) aplicado sob oclusão durante 24h conforme metodologias previamente publicadas^[9,11-17].

Foram definidas duas fases experimentais para cada produto:

- *Fase de protecção*: aplicação repetida de uma das formulações sob oclusão durante 8 dias, seguida de exposição ao LSS durante 24H;
- *Fase de reparação*: provocação com LSS durante 24H, seguida de aplicação da formulação sob oclusão até regularização dos resultados.

A área anatómica escolhida foi a face lateral de ambos os braços onde foram marcados 3 sítios destinados à aplicação das formulações e dos

Experimental Protocol

The mimeting agent of the cutaneous lesion was SLS (aqueous solution to 1%) applied under occlusion during 24H, according to previously published methodologies^[9,11-17].

For each product two experimental phases were defined:

- *Protection phase*: repeated application of one of the formulations under occlusion for 8 days, followed by exposure to SLS during 24H;
- *Repairing phase*: provocation with SLS during 24H, followed by the application of the formulation under occlusion until complete normalization of the results.

The anatomic area chosen was the lateral face of both arms where 3 sites were selected to apply the formulations and the respective controls (in a total of 6

respectivos controlos (num total de 6 sítios). Como controlos foram utilizados:

- Fase de protecção
 - Controlo 1 oclusão durante 8 dias, seguida de exposição ao LSS durante 24H
 - Controlo 2 exposição ao LSS durante 24H
- Fase de reparação
 - Controlo 3 Exposição ao LSS durante 24H seguida de oclusão até regularização dos resultados
 - Controlo 4 Oclusão durante o ensaio sem aplicação de LSS

A distribuição dos controlos e das formulações foi previamente aleatorizada (quadrado latino). A existência de 4 controlos diferentes permitiu não só avaliar a influência das formulações, mas também a influência da oclusão (Controlo 4) ou da sua ausência (Controlo 2).

O impacto biológico deste procedimento experimental foi clinicamente verificado, através de avaliação cutânea directa e, por meio de diversas técnicas biométricas consideradas como relevantes para a quantificação dos efeitos em estudo, designadamente:

Colorimetria Cutânea

A avaliação do grau de eritema e da luminosidade cutâneos é baseada no princípio da absorção^[25], e conseguida através do sistema Minolta Chromameter CR-300 (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japão). A determinação do grau de eritema é inferida através da cromaticidade vermelha (a^*) com a qual varia directamente, e a luminosidade através do índice de intensidade luminosa (L^*), a qual varia inversamente com o processo de melanogénese, isto é, com o progressivo escurecimento da pele. Ambas as variáveis são expressas em unidades arbitrárias (UAs)^[25].

Perda Transepidermica de Água (PTEA)

A PTEA é avaliada através do equipamento Tewameter® TM 300 (Courage Khazaka Electronic GmbH, Koln, Alemanha). Esta tecnologia avalia o gradiente transcutâneo de vapor que se estabelece entre a superfície da pele e o meio ambiente, sendo considerada como o mais importante indicador (quantitativo) da chamada “barreira cutânea”, sendo ainda utilizada na análise de eficácia de formulações tópicas cutâneas quando está envolvida a avaliação da capacidade hidratante^[26].

Para realizar as comparações entre os controlos e as zonas de aplicação de produto estabeleceu-se ainda um *end point* estatístico específico para cada uma das fases:

Fase de protecção - dia após a aplicação de LSS em que existem maiores diferenças entre o sítio de aplicação de produto e o controlo 1.

Fase de reparação - dia após a aplicação de LSS em que existem maiores diferenças entre o sítio de aplicação

sítios). The controls used were:

- Protection phase
 - Control 1 - occlusion for 8 days, followed by exposure to SLS during 24H
 - Control 2 - Exposure to SLS during 24H
- Repairing phase
 - Control 3 - Exposure to SLS during 24H followed by occlusion until normalization of the results
 - Control 4 - Occlusion during the trial without the application of SLS

The distribution of the controls and formulations was previously randomized (Latin square). The existence of 4 different controls allowed, not only for the evaluation of the influence of the formulations, but also for the influence of the occlusion (Control 4) or its absence (Control 2).

The biological impact of this experimental procedure was verified clinically through direct cutaneous evaluation and through several biometric techniques considered as relevant for the quantification of the effects under study, namely:

Cutaneous Colorimetry

The evaluation of the erythema degree and the cutaneous brightness is based on the absorption principle^[25], obtained through the Minolta Chromameter CR-300 (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japan) system. The determination of the erythema degree is inferred through the red chromaticity (a^*) which is varied with directly, and the brightness through the index of luminous intensity (L^*), which varies inversely with the melanogenesis process, that is, with the progressive darkening of the skin. Both variables are expressed in arbitrary units (AUs)^[25].

Trans Epidermal Water Loss (TEWL)

TEWL is evaluated through the Tewameter® TM 300 (Courage - Khazaka Electronic GmbH, Koln, Germany) equipment. This technology evaluates the transcutaneous water gradient that is established between the surface of the skin and the environment, being considered as the most important indicator (quantitative) of the so called “cutaneous barrier”, and still used in the analysis of effectiveness of cutaneous topical formulations when the evaluation of the moisturizing capacity is involved^[26].

To accomplish the comparisons between the controls and the areas of product application, a specific statistical *end point* for each one of the phases was defined:

Protection phase - the day after the application of SLS, where the major differences between the application site and control 1 were verified.

Repairing phase - the day after the application of SLS where the major differences between the site of

de produto e o controlo 3, excluindo a primeira semana.

Foi calculado também o “tempo de recuperação” da pele, assumido como o dia após LSS, em que os valores de cada variável igualavam o valor basal afectado de uma variação de 5%.

Estatística

Os dados experimentais foram comparados pelo Teste de Wilcoxon (não paramétrico) para dados emparelhados e o Teste de Mann Whitney utilizado para dados independentes, adoptando-se o nível de significância de 95%.

Todas as avaliações estatísticas foram realizadas com os programas SPSS e MS Excel.

Resultados e Discussão

Fase de protecção

A avaliação do impacto biológico das formulações, no que respeita ao estudo da Capacidade de Protecção face à agressão com LSS, é evidenciada na tabela II onde se encontra sumariada a evolução do grau de eritema e PTEA ao longo de todo o estudo nas zonas protegida com as formulações e não protegida.

application and control 3 were verified, excluding the first week.

The “time of recovery” of the skin was also calculated and defined as the day after SLS, in which the values of each variable equal the basal value affected by a variation of 5%.

Statistics

The experimental data was compared with the Wilcoxon Rank signs test (non parametric) for related samples and Mann Whitney's Test used for independent samples, adopting a significance level of 95%.

All of the statistical evaluations were performed with the programs SPSS and MS Excel.

Results and Discussion

Protection phase

Regarding the Protection Capacity study, the evaluation of the biological impact of the formulations to the aggression with SLS is shown in table II, where the evolution of the degree of erythema and TEWL in the protected and unprotected areas is described.

Grau de Eritema (UA) - Degrce of Erythema (AU)							
	D8	D9	D10	D12	D15	D17	Comparação (Comparison)
Formulação A (Formulation A)	12,0 ± 2,0	12,3 ± 2,1	12,5 ± 2,1	12,2 ± 2,0	12,0 ± 1,8	12,3 ± 1,7	p=0,005
Controlo Form. A (Control Form. A)	12,3 ± 2,2	13,2 ± 3,2	13,9 ± 2,7	13,2 ± 2,3	12,6 ± 2,1	12,5 ± 2,1	
Formulação B (Formulation B)	11,6 ± 2,3	11,2 ± 2,3	12,3 ± 2,5	12,1 ± 2,3	11,9 ± 1,8	11,7 ± 1,9	p=0,011
Controlo Form. B (Control Form. B)	11,6 ± 2,2	13,5 ± 3,2	14,0 ± 3,4	13,2 ± 2,9	12,7 ± 2,4	12,3 ± 1,9	
PTEA (g/h.m2) - TEWL (g/h.m2)							
	D8	D9	D10	D12	D15	D17	Comparação (Comparison)
Formulação A (Formulation A)	10,0 ± 4,1	15,5 ± 7,1	14,4 ± 7,0	11,6 ± 4,2	9,5 ± 3,3	10,6 ± 8,4	p=0,002
Controlo Form. A (Control Form. A)	8,7 ± 4,1	27,5 ± 20,2	21,4 ± 16,0	16,3 ± 7,7	10,7 ± 3,7	11,4 ± 6,3	
Formulação B (Formulation B)	11,1 ± 2,9	15,2 ± 5,6	15,3 ± 4,3	16,3 ± 6,2	13,6 ± 7,2	10,8 ± 3,2	p=0.003
Controlo Form. B (Control Form. B)	8,4 ± 2,5	27,4 ± 18,5	23,7 ± 15,5	20,3 ± 8,2	15,0 ± 7,1	11,6 ± 3,5	

Tabela II Evolução do Eritema e PTEA, ao longo do tempo. A comparação estatística foi realizada entre a zona de aplicação da formulação contra o respectivo controlo. O momento escolhido para a comparação foi o *end point* estatístico (D10 para o grau de Eritema e PTEA da Formulação A e D10 para grau de Eritema e D9 para PTEA da Formulação B) (ver texto) (média ± desvio-padrão).

Table II - Evolution over time of Erythema and TEWL. The statistical comparison was verified in the site of application of the formulation against the respective control. The moment chosen for the comparison was the statistical end point (D10 for the degree of Erythema and TEWL of Formulação A and D10 for the degree of Erythema and D9 for TEWL for Formulação B) (see text) (average ± standard deviation)

Estes resultados demonstram que, na zona sujeita à prévia aplicação (1 semana) das formulações em estudo, a irritação local e o compromisso da barreira cutânea após provocação com o LSS foram significativamente menores para ambas as formulações em relação à zona não protegida.

O tempo de recuperação (Tabela III) confirmou este efeito, uma vez que a recuperação foi significativamente mais rápida nas zonas onde se aplicaram as formulações do que nos controlos. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de recuperação das duas formulações, tanto para o grau de Eritema ($p=0,325$), como para a PTEA ($p=0,117$). Este resultado sugere que ambas as formulações, apesar de diferentes sob o ponto de vista galénico e dos conteúdos absolutos em ZnO e Vitamina A diferentes, foram igualmente eficazes na protecção da pele face a agressões exteriores. Também indica que apesar da formulação A ser um spray isso não prejudica a sua capacidade protectora, em comparação com uma fórmula tradicionalmente mais protectora como é a pomada.

Tabela III Tempos de recuperação da pele nos vários locais analisados após exposição ao LSS durante 24H.
Table III - Times of recovery of the skin in the several places analyzed after exposition to SLS during 24H.

	Grau de Eritema (Degree of Erythema)	PTEA (TEWL)
Formulação A (Formulation A)	3.3	6.4
Controlo 1 (Control 1)	7.3	9.4
Controlo 2 (Control 2)	8	9.7
Formulação B (Formulation B)	4.9	8.4
Controlo 1 (Control 1)	9.2	10.3
Controlo 2 (Control 2)	10.1	10.2

Uma outra evidência da capacidade protectora da pele encontra-se na correlação PTEA - Eritema. Efectivamente, verifica-se que, nas zonas onde existiu a aplicação das formulações A e B (figura 1a) não foi possível estabelecer uma correlação significativa entre as variáveis, uma vez que a PTEA e o grau de Eritema não variaram em relação ao basal, o que sugere uma eficaz protecção da pele à agressão do contacto com LSS. Nas zonas controlo (figura 1b) essa correlação é evidente e estatisticamente significativa.

A conjugação da evolução das variáveis no *end point* estatístico, da determinação do tempo de recuperação e do cálculo e avaliação da correlação PTEA vs grau de Eritema, permitiu confirmar a capacidade das duas apesar das diferenças já apontadas, em proteger a pele da exposição ao LSS.

Fase de reparação

Na tabela IV registam-se os principais acontecimentos observados nas zonas, tratada e não tratada, com as formulações testadas.

These results reveal that, in the area subjected to the previous application (1 week) of the formulations in study, the local irritation and the disruption of the cutaneous barrier after provocation with SLS was significantly smaller for both formulations than in the unprotected area.

The time of recovery (Table III) confirmed this effect, once the recovery was significantly faster in the areas where the formulations were applied than in the controls. However, significant differences were not observed between the times of recovery of the two formulations, as for the degree of Erythema ($p=0,325$) and TEWL ($p=0,117$). This result suggests that both formulations, in spite of different galenic forms and differences in the absolute contents of ZnO and Vitamin A, were equally effective in the protection of the skin to external aggressions. It also demonstrates that although Formulation A is a spray, that does not compromise its protective capacity, in comparison with a formula traditionally more protective as is the ointment.

Another evidence of the protective capacity of the skin was verified in the correlation TEWL - Erythema. In effect, it is verified that, in the areas where the application of formulations A and B occurred (Figure 1a), it was not possible to establish a significant correlation among the variables, once TEWL and the degree of Erythema does not change in relation to the basal. That suggests an effective protection of the skin to the aggression with SLS. In the control areas (Figure 1b) that correlation is evident and statistically significant.

The combination of the evolution of the variables in the statistical end point, of the determination of the time of recovery and of the calculation and evaluation of the correlation TEWL vs degree of Erythema, confirm the capacity of the two formulations to protect the skin from SLS.

Repairing phase

In table IV the main events observed in the areas that were treated and untreated, are registered with the tested formulations.

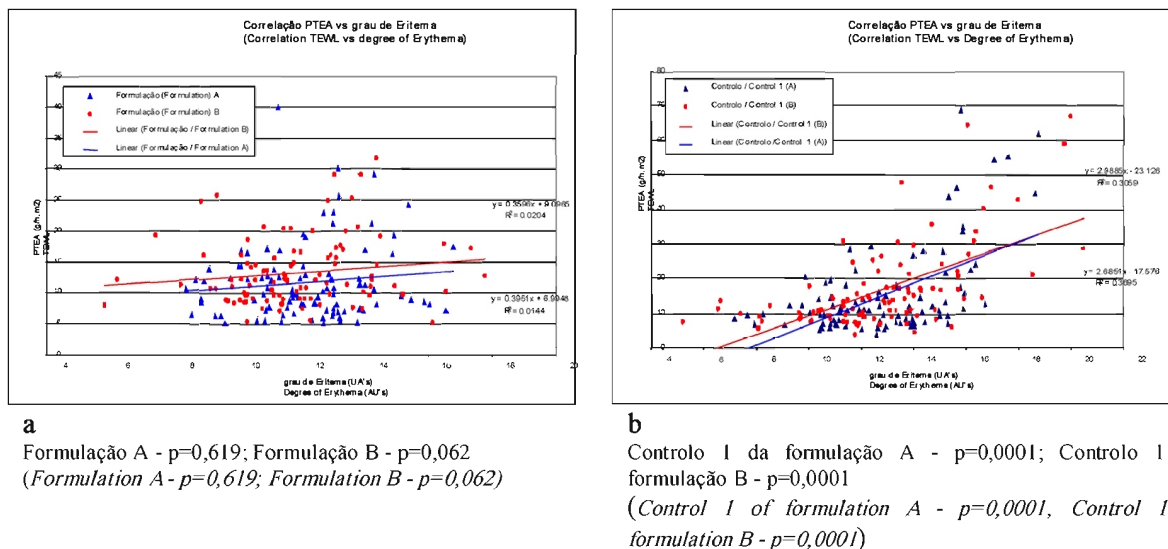


Figura 1 Correlação PTEA vs grau de Eritema nas zonas previamente tratadas com as formulações em estudo (a) e nas zonas não tratadas sob oclusão durante 1 semana (b). Em itálico encontra-se a significância das correlações estabelecidas.

Figure 1 - Correlation TEWL vs degree of Erythema in the areas previously treated with the formulations in study (a) and in the untreated areas under occlusion for 1 week (b). In italic is the significance of the established correlations.

Tabela IV Fase de reparação Evolução do Eritema e PTEA, ao longo do tempo. A A comparação estatística foi realizada entre a zona de aplicação da formulação contra o respectivo controlo. O momento escolhido para a comparação foi o *end point* estatístico (D14 para o grau de Eritema e D9 para a PTEA da Formulação A e D11 para grau de Eritema e PTEA da Formulação B) (ver texto) (média $\pm$ desvio-padrão)

Table IV - Repairing phase Evolution over time of Erythema and TEWL. The statistical comparison was verified in the application site of the formulation against the respective control. The moment chosen for the comparison was the statistical end point (D14 for the degree of Erythema and D9 for TEWL of Formulation A and D11 for the degree of Erythema and TEWL of Formulation B) (see text) (average + standard deviation).

Grau de Eritema (UA) - Degree of Erythema (AU)										
	D0	D1	D2	D4	D7	D9	D11	D14	D16	Comparação (Comparison)
Formulação A (Formulation A)	11,4 ± 1,1	14,6 ± 1,5	14,3 ± 1,6	13,2 ± 2,1	12,6 ± 1,8	12,0 ± 1,6	11,7 ± 1,3	11,3 ± 1,5	11,0 ± 0,5	p=0,001
Controlo Form. A (Control Form. A)	11,2 ± 1,3	14,3 ± 2,3	14,4 ± 2,1	13,7 ± 2,0	13,0 ± 1,5	12,8 ± 1,5	12,5 ± 1,2	12,3 ± 1,5	11,4 ± 0,7	
Formulação B (Formulation B)	11,2 ± 2,3	13,0 ± 3,0	12,7 ± 2,5	12,4 ± 2,7	12,2 ± 2,1	11,6 ± 2,2	11,4 ± 1,6	11,5 ± 1,7	10,7 ± 2,0	p=0,001
Controlo Form. B (Control Form. B)	10,6 ± 2,4	12,6 ± 2,6	13,0 ± 2,3	12,8 ± 2,2	12,6 ± 2,5	12,5 ± 2,7	12,4 ± 2,2	11,9 ± 1,3	11,3 ± 1,5	
PTEA (g/h.m2) - TEWL (g/h.m2)										
	D0	D1	D2	D4	D7	D9	D11	D14	D16	Comparação (Comparison)
Formulação A (Formulation A)	8,6 ± 1,8	22,0 ± 9,7	23,6 ± 12,1	23,9 ± 11,5	14,1 ± 8,1	11,3 ± 4,6	10,2 ± 2,6	7,8 ± 2,0	6,6 ± 0,9	p=0,001
Controlo Form. A (Control Form. A)	7,4 ± 1,6	21,9 ± 13,3	25,9 ± 12,1	25,7 ± 15,0	16,5 ± 9,9	14,1 ± 6,1	11,8 ± 3,8	9,5 ± 2,9	10,6 ± 2,0	
Formulação B (Formulation B)	8,9 ± 1,8	18,1 ± 6,0	23,1 ± 9,8	23,2 ± 11,1	16,4 ± 9,6	13,0 ± 3,4	11,8 ± 2,6	9,6 ± 2,6	8,4 ± 1,6	p=0,027
Controlo Form. B (Control Form. B)	8,3 ± 1,5	19,8 ± 7,1	23,3 ± 8,4	25,7 ± 10,7	18,1 ± 6,9	16,0 ± 3,7	15,2 ± 3,8	10,5 ± 2,4	8,8 ± 2,6	

Como se observa, a alteração das variáveis após contacto com a LSS estabilizam mais rápida e significativamente na zona de aplicação das formulações A e B do que na zona de controlo não tratada (tabela IV). De igual modo, o tempo de recuperação (tabela V) confirma estes resultados uma vez que a recuperação é significativamente mais rápida nas zonas onde se aplicaram as formulações do que nas zonas de controlo não tratadas. No entanto, mais uma vez, não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de recuperação das duas formulações, tanto para o grau de Eritema ($p=0,312$), como para a PTEA ($p=0,078$) confirmando a capacidade de reparação da pele para ambas as formulações, apesar das diferenças conhecidas.

As it is observed, the change of the variables after contact with SLS stabilizes faster and more significantly in the application area of formulations A and B than in the area of control (table IV). In the same way, the time of recovery (table V) confirms these results once the recovery is significantly faster in the areas where the formulations were applied than in the control area. However, once again, significant differences were not observed between the times of recovery of the two formulations, for both the degree of Erythema ($p=0,312$) and TEWL ($p=0,078$), confirming the repairing capacity of the skin for both formulations, in spite of the known differences.

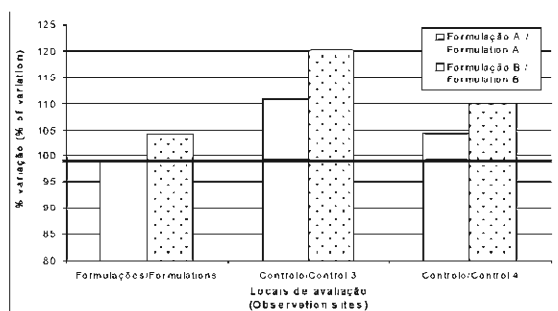
Tabela V - Tempo médio de recuperação (em dias) das variáveis em estudo, nas áreas de pele tratadas com a formulação A (spray) e com a formulação B (pomada), bem como com as zonas não tratadas respectivas (Controlos 3 e 4), após provocação com LSS (ver texto)

Table V - Average time of recovery (in days) of the variable in study, in the skin areas treated with formulation A (spray) and with formulation B (ointment), as well as with the respective untreated areas (Controls 3 and 4), after provocation with SLS (see text)

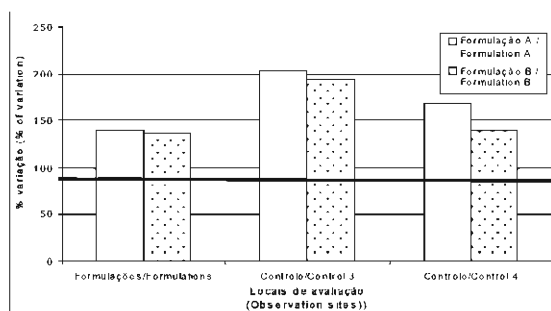
	Grau de Eritema (Degree of Erythema)	PTEA (TEWL)
Formulação A (Formulation A)	9.1	10.9
Controlo 3 (Control 3)	14.3	14.5
Controlo 4 (Control 4)	6.4	10.9
Formulação B (Formulation B)	10.9	12.8
Controlo 3 (Control 3)	13.3	15.0
Controlo 4 (Control 4)	6.6	8.9

A avaliação de ambas as formulações no *end point* estatístico permitiu verificar que as zonas onde se aplicaram as formulações se encontram próximas do Controlo 4 (oclusão sem contacto com LSS) e significativamente diferentes do Controlo 3 (contacto com LSS) (Figura 2).

The evaluation of both formulations in the statistical end point allowed to verify that the areas where the formulations were applied are close to Control 4 (occlusion without contact with SLS) and significantly different from Control 3 (contact with SLS) (Figure 2).



a



b

Figura 2 Variação em relação ao basal (em %) do Eritema (a) e da PTEA (b) nas zonas tratadas e não tratadas, no *end point* estatístico (a linha a amarelo corresponde ao valor basal - 100%). Aqui as zonas onde se aplicaram as formulações já se encontravam próximas (ou mesmo no) do valor basal (0 a 40% de diferença), enquanto que no Controlo 3 ainda se encontravam significativamente diferentes (11 a 104% diferentes)

Figure 2 - Variation related to the basal values (in %) of Erythema (a) and of TEWL (b) in the treated and untreated areas, in the statistical end point (the line in black corresponds to the basal value - 100%). Here, the areas where the formulations were applied are close to (or even in) the basal value (0 to 40% of difference), while in Control 3 they were still significantly different (11 to 104% different).

Conclusão

O método proposto parece constituir uma estratégia de objectivação de impacto biológico da lesão cutânea muito útil, sobretudo se considerarmos ser desenvolvida na pele humana *in vivo*, em condições padronizadas e clinicamente controladas. Em consequência, os resultados obtidos evidenciam uma clara adequação do modelo experimental aos objectivos inicialmente definidos para a descrição do perfil do impacto biológico das duas formulações sobre a protecção e reparação da lesão cutânea.

As variáveis biométricas escolhidas parecem ser adequadas à descrição dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à alteração da integridade cutânea por exposição ao LSS em qualquer das fases do estudo, e portanto, adequadas ao seguimento clínico quantitativo que se pretendia. A definição de momentos de avaliação específicos, como o *end point* estatístico e o tempo de recuperação, e a análise das correlações PTEA-Eritema contribuem também para melhor ilustrar a eficácia protectora e reparadora das formulações, permitindo ainda identificar o momento exacto da protecção e da reparação cutânea, um indicador útil na avaliação deste tipo de eficácia terapêutica.

Apesar de o presente trabalho não se centrar no estudo detalhado do efeito protector / reparador das formulações per se, os resultados obtidos nas presentes condições experimentais sublinham e de modo claramente objectivo, o interesse das formulações tópicas com elevada relação ZnO-Vit.A na protecção e reparação da lesão cutânea.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos *Laboratórios Grunenthal* a amável disponibilidade demonstrada no acesso às formulações utilizadas no presente estudo.

Bibliografia / References

- [1]. Romanelli M, Mastronicola D, Gaggio G, Noninvasive physical measurements of wound healing. In: Rovee D, Maibach H, editors. The epidermis in wound healing, Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 125-140.
- [2]. Rodrigues LM, Magro JM, Pinto PC, Mouzinho M^a, Almeida M^aA, Non-invasive assessment of wound healing pathophysiology by transcutaneous indicators, *Ann Burns Fire Disasters*, 2004; Vol.27, 3: 131-136.
- [3]. Magro J, Rodrigues LM, Fisiopatologia da lesão cutânea. Mecanismos humorais e celulares, *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, 2004; 2:67-76.
- [4]. Oliveira GV, Chinkes D, Mitchell C, Oliveras G, Hawkins HK, Herndon DN, Objective assessment of burn scar vascularity, erythema, pliability, thickness, and planimetry, *Dermatol Surg*, 2005, 31(1): 48-58.
- [5]. Yang L, Mao-Qiang M, Taljebini M, Elias PM, Feingold KR, Topical stratum corneum lipids accelerate Barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment, *Br. J. Dermatol*, 1995; 133,5:679-685.
- [6]. Man MQ, Feingold KR, Elias PM, Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin, *Arch. Dermatol*, 1993; 129, 6: 728-738.

Conclusion

The proposed method seems to constitute a very useful strategy for studying the biological impact of the cutaneous lesion, especially if we consider that it was developed in the *in vivo* human skin, in standardized and clinically controlled conditions. Consequently, the obtained results show a clear adaptation of the experimental model to the purposes initially defined for the description of the profile of the biological impact of the two formulations in the protection and repair of the cutaneous lesion.

The biometric variables chosen seem to be appropriate for the description of the physiopathologic mechanisms underlying the change of the cutaneous integrity by means of exposure to SLS in any of the phases of the study, and therefore, are appropriate for the quantitative clinical follow-up that was intended. The definition of specific moments of evaluation, as the statistical end point and the time of recovery, and the analysis of the correlations TEWL - Erythema also contribute to better illustrate the protective and reparative effectiveness of the formulations, still allowing the identification of the exact moment of the protection and of the cutaneous repairing, a useful indicator in the evaluation of this type of therapeutic efficacy.

The present study is not centered on the detailed study of the protective / reparative effect of the formulations, however, the results obtained in these experimental conditions clearly underline the interest of the topical formulations with high relationships ZnO-Vit.A to the protection and repairing of the cutaneous lesion.

Acknowledgements

The authors wish to thank the *Laboratórios Grunenthal* for the kind readiness demonstrated in providing access to the formulations used in the present study.

- [7]. Reed JT, Ghadially R, Elias PM, Skin type, but neither race nor gender, influence epidermal permeability barrier function, *Arch. Dermatol*, 1995; 131, 10: 1134-1138.
- [8]. Loden M, Barany E, Skin-identical lipids versus petrolatum in the treatment of tape-stripped and detergent-perturbed human skin, *Acta. Dermatol. Venereol.*, 2000; 80, 6: 412-415.
- [9]. Zhai H, Maibach H. Micro wound healing models . In: Rovee D, Maibach H, editors. *The epidermis in wound healing*, Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 141-151.
- [10]. Rosado C, Rodrigues LM, In vivo study of the physiological impact of stratum corneum sampling methods. *International J Cosm Science*, 2003; 25:37-44
- [11]. Schluter-Wigger W, Elsner P, Efficacy of 4 commercially available protective creams in the repetitive irritation test (RIT), *Contact Dermatitis*, 1996; 34,4:278-283.
- [12]. Wigger-Alberti W, Rougier A, Richard A, Elsner P, Efficacy of protective creams in a modified repeated irritation test. *Methodological aspects*, *Acta Derm Venereol*, 1998; 78,4:270-273.
- [13]. Fluhr, J. W., Bornkessel, A., Akengin, A., Fuchs, S., Norgauer, J., Kleesz, P., Grieshaber, R., Elsner, P., Sequential application of cold and sodium lauryl sulphate decreases irritation and barrier disruption in vivo in humans, *Br J Dermatol*, 2005; 152,4: 702-708.
- [14]. Jackwerth B, Krächter HU, Matthies W, Dermatological test methods for optimising mild tenside preparations. *Parfümerie und Kosmetik*. 1993; 74:134-141.
- [15]. Wilhelm, KP, Freitag G, Wolf HH, Surfactant induced skin irritation and skin repair. Evaluation of the acute irritation model by non-invasive techniques, *J.Am Acad Dermatol*. 1994; 30: 944.
- [16]. Lee, CH, Maibach H. Sodium Lauryl Sulfate in Dermatotoxicology. In: Zhai H, Maibach H, editors. *Dermatotoxicology*, Boca Raton: CRC Press; 2004. pp. 479-506.
- [17]. Zhai, H., Poblete, N., Maibach H, Sodium lauryl sulfate damaged skin in vivo in man: a water barrier repair model, *Skin Res Technol*, 1998; 4: 24.
- [18]. World Medical Association declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects , amended until 2004.
- [19]. EUROPEAN DIRECTIVE 2001/20/EC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct. of clinical trials on medicinal products for human use, *Off J Europ Communities*, L121/34-44, 2001.
- [20]. Note for Guidance on Good Clinical Practice, ICH E6 GCP96, EMEA, 2002: pp1-55.
- [21]. Diário da República, Lei 46/2004 de 19 de Agosto.
- [22]. Sibbald RG, Campbell K, Coutts P, Queen D, Intact skin-an integrity not to be lost, *Ostomy Wound Manage*, 2003; 49(6):27-8 .
- [23]. Baldwin S, Odio MR, Haines SL, O'Connor RJ, Englehart JS, Lane AT., Skin benefits from continuous topical administration of a zinc oxide/petrolatum formulation by a novel disposable diaper, *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001 Sep;15 Suppl 1:5-11.
- [24]. Agren MS., Studies on zinc in wound healing. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1990;154:1-36
- [25]. Piérard G.E., Berardesca E., Gummer C.L., Léveque J.L., Loden M., Masson P., Parra JL, Rodrigues L., Rogiers V., Salter D., Threvethan M., EEMCO Guidance for the Assessment of Skin Colour, *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1998; 10: 1-11.
- [26]. Rogiers, V., Berardesca, E., Gummer, C.L., Léveque, J.L., Loden, M., Masson, Ph., Parra, J.L., Piérard, G.E, Rodrigues, L., and Threvethan, M., EEMCO Guidance for the assessment of the transepidermal Water loss (TEWL) in cosmetic sciences, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 2001; 14: 117-128.