DESENVOLVIMENTO DE GEL CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE ALPINIA ZERUMBET (PERS.) B. L. BURTT & R. M. SM. PARA A REGENERAÇÃO CUTÂNEA

DEVELOPMENT OF A GEL CONTAINING ESSENTIAL OIL OF ALPINIA ZERUMBET (PERS.) B. L. BURTT & R. M. SM. FOR SKIN REGENERATION

DESARROLLO DE GEL QUE CONTIENE ACEITE ESENCIAL DE ALPINIA ZERUMBET (PERS.) B. L. BURTT & R. M. SM. PARA LA REGENERACIÓN DE LA PIEL

10.56238/IIMultiCientifica-136

Ângela Cristina Pires Belchior dos Santos
Mestre em Ciência e Tecnologia Farmacêutica
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
E-mail: angelacpbs@gmail.com
Orcid: https://orcid.org/0000-0003-0219-1237

Naomi Kato Simas
Doutora em Química de Produtos Naturais
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
E-mail: naomisimas@yahoo.com
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-9929-2714

Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva
Doutor em Ciências Farmacêuticas
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
E-mail: lulaufrj@hotmail.com
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-6746-5756

Zaida Maria Faria de Freitas
Doutora em Fármacos e Medicamentos
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
E-mail: zaida@pharma.ufrj.br
Orcid: 0000-0001-6044-171

Elisabete Pereira dos Santos
Doutora em Ciências Farmacêuticas
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
E-mail: elisabetepharma@gmail.com
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-6712-0643

RESUMO
Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. é uma espécie exótica da família Zingiberaceae que contém óleo essencial (EOAz), com efeito inibidor de inflamação e promotor de reparo tecidual. Este artigo tem como objetivo apresentar o desenvolvimento de uma formulação tópica regeneradora cutânea com OEAz, devido a escassez de estudos sobre o desenvolvimento dessas formulações com o óleo, voltadas ao rejuvenescimento e a cicatrização da pele. Utilizaram-se os seguintes métodos: GC-MS, DPPH, no OEAZ; pH, densidade, características organolépticas e o fator de oclusão, nas formulações de gel com e sem OEAz; ensaio MTT e teste de migração, nas formulações e no OEAz. Pelo GC-MS, identificaram-se, como resultados, os principais compostos antioxidantes do EOAz: 4-terpineol (21,67%), 1,8-cineol (12,66%) e p-cimeno (5,57%). Os efeitos citotóxicos (via MTT) e o reparo tecidual (via teste de migração) foram avaliados no OEAz e na formulação de gel sem o óleo. Portanto, a estabilidade acelerada foi avaliada na formulação de gel contendo OEAz, o qual apresentou concentração máxima não citotóxica de 0,25 mg/mL e efeito migratório, demonstrando seu potencial cicatrizante e regenerador em queratinócitos humanos.

Palavras-chave: Alpinia Zerumbet (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. Óleo Essencial. Atividade Antioxidante. Citotoxicidade. Reparação Tecidual.

ABSTRACT
Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. is an exotic species of the Zingiberaceae family that contains essential oil (EOAz), with an inflammation-inhibiting effect and tissue repair-promoting activity. This article aims to present the development of a topical skin-regenerating formulation containing EOAz, due to the scarcity of studies on the development of these formulations with the oil, aimed at skin rejuvenation and wound healing. The following methods were used: CG-SM and DPPH for EOAz; pH, density, organoleptic characteristics, and occlusion factor for the gel formulations with and without EOAz; MTT assay and migration assay for the formulations and EOAz. By GC-MS, the following major antioxidant compounds of EOAz were identified as results: terpinen-4-ol (21.67%), 1,8-cineole (12.66%), and p-cymene (5.57%). Cytotoxic effects (by MTT assay) and tissue repair (by migration assay) were evaluated in EOAz and in the gel formulation without the oil. Therefore, accelerated stability was evaluated in the gel formulation containing EOAz, which showed a maximum non-cytotoxic concentration of 0.25 mg/mL and a migratory effect, demonstrating its wound-healing and regenerative potential in human keratinocytes.

Keywords: Alpinia Zerumbet (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. Essential Oil. Antioxidant Activity. Cytotoxicity. Tissue Healing.

RESUMEN
Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. es una especie exótica de la familia Zingiberaceae que contiene aceite esencial (EOAz), con efecto inhibidor de inflamación y actividad promotora de reparación tisular. Este artículo tiene como objetivo presentar el desarrollo de una formulación tópica regeneradora de la piel que contiene EOAz, debido a la escasez de estudios sobre el desarrollo de estas formulaciones con el aceite, dirigidas al rejuvenecimiento de la piel y la cicatrización de heridas. Se utilizaron los siguientes métodos: GC-MS y DPPH para EOAz; pH, densidad, características organolépticas y factor de oclusión para las formulaciones de gel con y sin EOAz; ensayo de MTT y ensayo de migración para las formulaciones y EOAz. Por GC-MS, se identificaron los siguientes compuestos antioxidantes principales de EOAz como resultados: terpinen-4-ol (21,67%), 1,8-cineol

(12,66%) y p-cimeno (5,57%). Los efectos citotóxicos (por ensayo de MTT) y la reparación tisular (por ensayo de migración) se evaluaron en EOAz y en la formulación de gel sin el aceite. Por lo tanto, la estabilidad acelerada se evaluó en la formulación de gel que contiene EOAz, que mostró una concentración máxima no citotóxica de 0,25 mg/mL y un efecto migratorio, demostrando su potencial cicatrizante y regenerativo en queratinocitos humanos.

Palabras clave: Alpinia Zerumbet (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. Aceite Esencial. Actividad Antioxidante. Citotoxicidad. Cicatrización Tisular.

1 INTRODUÇÃO

As formulações cosméticas são preparações de consistência semissólida, como emulsões, cremes e géis, destinadas à aplicação sobre a pele, com a finalidade de promover cuidado e/ou tratamento (Campos; Mercúrio, 2014). Dentre essas opções, as emulsões do tipo óleo em água (O/A) apresentam propriedades emolientes, que favorecem o espalhamento, a absorção e a sensação de lubrificação na pele. Além de conter antioxidantes, que auxiliam na preservação da formulação contra processos oxidativos; conservantes, que protegem a ação microbiana; e umectantes, que retêm água e auxiliam na prevenção do ressecamento cutâneo (Aulton; Taylor, 2016).

Diversas substâncias de interesse para aplicação cosmética, por apresentarem atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias, correspondem aos óleos essenciais obtidos de diferentes espécies vegetais (Singh, 2019). Acredita-se que esses óleos sejam absorvidos pela camada superior da derme, podendo exercer efeitos biológicos no tecido cutâneo (Winkelman, 2018). O óleo essencial das folhas da espécie exótica *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt e R. M. Sm. (OEAz), pertencente à família Zingiberaceae, apresenta atividade antibacteriana e antifúngica frente a diversos microrganismos (Jezler *et al.*, 2013). Além disso, o OEAz demonstrou capacidade de inibir mais de 80% da peroxidação lipídica quando comparado ao antioxidante padrão vitamina E (BRASIL, 2014). Diversos estudos, por meio de análises cromatográficas gasosas acopladas à espectrometria de massas (CG-EM), demonstraram que os compostos 4-terpineol e 1,8-cineol são identificados em maiores concentrações no OEAz (Barcelos *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2018). Assim, são considerados componentes relevantes do óleo essencial e associados a efeitos inibitórios sobre processos inflamatórios (Júnior *et al.*, 2017). O OEAz também apresenta evidências de efeito reparador sobre o tecido epitelial (Santana *et al.*, 2016), além de atividades antioxidante, antienvelhecimento e antimelanogênica (Tu; Tawata, 2015).

As substâncias naturais que apresentam atividade biológica não podem ser utilizadas sem que sejam previamente submetidas a avaliações extensivas de toxicidade, antes de sua aprovação para uso. Atualmente, observa-se uma tendência à substituição de testes que utilizam modelos animais por métodos alternativos *in vitro* (ANVISA, 2012; Russell; Burch, 2009; Brasil, 2012). Dessa forma, os óleos essenciais têm sido avaliados quanto ao seu potencial citotóxico por meio de ensaios de viabilidade celular, com o objetivo de verificar sua segurança para aplicações tópicas em fotoprotetores e outros produtos destinados à conservação da pele. Entre os métodos empregados, destaca-se o ensaio

colorimétrico utilizando MTT (Coelho *et al.*, 2018; Gündel *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2018; Batista *et al.*, 2021).

Além disso, os terpenos presentes nos óleos essenciais são amplamente estudados, havendo relatos na literatura de que o método MTT permite avaliar a influência de monoterpenos e seus derivados sobre o metabolismo celular, por meio da indução da atividade da enzima succinato desidrogenase (Paduch *et al.*, 2016).

A atividade antioxidante do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) pode ser investigada considerando seus principais componentes monoterpênicos. Alguns estudos demonstraram que determinados terpenos apresentam atividade de eliminação do radical DPPH, embora em intensidade variável quando comparados a outros compostos antioxidantes (Yang *et al.*, 2010; Paduch *et al.*, 2016).

Conforme descrito na literatura, o efeito oclusivo de uma formulação pode influenciar a hidratação do estrato córneo, especialmente em aplicações prolongadas, além de favorecer a penetração de compostos ativos na pele (Montenegro *et al.*, 2015 apud Fluhr; Holleran; Berardesca, 2002). Dessa forma, a avaliação do efeito oclusivo tem se apresentado um parâmetro relevante durante o desenvolvimento de formulações tópicas (Bucks *et al.*, 2005; Gkotsis *et al.*, 2018; Lynde, 2001).

Pesquisas envolvendo óleos essenciais ricos em compostos terpenoides têm avaliado sua atividade cicatrizante por meio de ensaios *in vitro* utilizando fibroblastos. Esses estudos demonstram que a viabilidade celular pode ser dependente da concentração do óleo essencial. Embora alguns óleos essenciais apresentem baixa interferência sobre a proliferação de fibroblastos, podem influenciar positivamente a migração celular, evidenciando características pró-cicatrizantes, com potencial para redução de cicatrizes, aumento da resistência à tração e aceleração do processo de reparo tecidual (Salas-Oropeza *et al.*, 2020).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é apresentar os resultados obtidos na dissertação de mestrado de Santos (2022), através do desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas, oclusivas e citotóxicas de uma formulação semissólida, na forma de gel-creme, contendo óleo essencial de *Alpinia zerumbet,* para aplicação em regeneração cutânea e visando à obtenção de um produto seguro e eficaz para aplicação tópica em um contexto de meio ambiente, unindo a botânica com o desenvolvimento galênico.

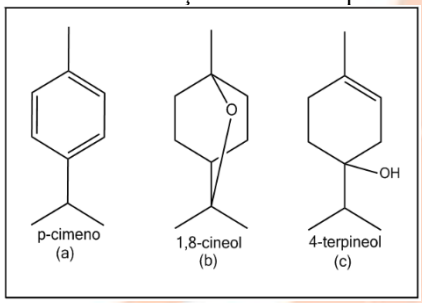
2 MATERIAIS E MÉTODOS

Óleo essencial da folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm., Zingiberaceae foi obtido das folhas da planta e fornecido por Treepac Óleos essenciais e Hidrolatos (Brazil), está cadastrado no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o nº A320BA9. Os métodos utilizados para analisar o OEAz foram CG-EM, a atividade antioxidante por 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), a citotoxicidade in vitro. Os métodos utilizados para analisar o gel creme com e sem o OEAz estabilidade, aspectos organolépticos, pH, densidade, viscosidade e fator de Oclusão. Os métodos utilizados nas formulações e no OEAz foram o de citotoxicidade in vitro (via MTT) e o de reparação tecidual (via teste de migração). A composição da formulação semissólida tipo gel creme com o OEAz foi preparada. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism®, versão 8.0. Aplicou-se o teste estatístico de análise de variância, com significância estatística determinada para 95% (ANOVA Oneway, $p \geq 0,05$) e teste Tukey como post-test. (Santos, 2022)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, através da análise de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM) do OEAz podem ser identificados 3 compostos voláteis como principais: p-cimeno (a), 1,8-cineol (b) e 4-terpineol (c), apresentados na figura 1.

Figura 1. Compostos identificados em maior concentração no OEAz.: p-cimeno (a), 1,8-cineol (b) e 4-terpineol (c).



Fonte: Adaptada de Santos, 2022, p.22

Pela análise da constituição química do óleo essencial das folhas de *A. zerumbet,* realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), foi possível identificar os constituintes já descritos na literatura como os principais do óleo dessa planta (Zoghbi *et al.* 1999; Castro *et al.* 2016), nas faixas de tempo de retenção de 8,900-8,985; 9,035-9,110 e 11,625-11,760

minutos referentes aos monoterpenos p-cimeno (5,57%), 1,8-cineol (12,66%) e 4-terpineol (21,67%), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Análise via CG-EM e identificação dos monoterpenos principais do OEAz

Sinal	t_R (min)	Composto	Fórmula	IDH
9	8,942	*p*-cymene	$C_{10}H_{14}$	4
11	9,072	1,8-cineole	$C_{10}H_{18}O$	2
18	11,625	4-terpineol	$C_{10}H_{18}O$	2

Fonte: Adaptada de Tu and Tawata (2015, p.16725); Cardoso *et al.* (2018, p. 2256)

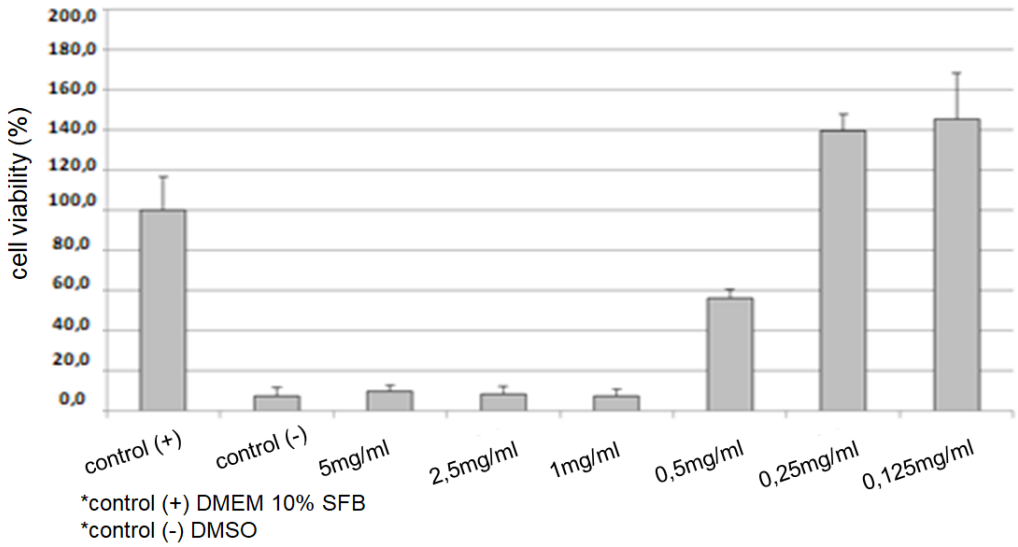
Apesar de o perfil químico do estudo ter diferido da descrição para as folhas de *A. zerumbet* já relatada na literature, está em concordância com a descrição do monoterpeno terpinen-4-ol (21,67%) como o componente majoritário (Zoghbi *et al.* 1999; Barcelos *et al.* 2010; Cunha *et al.* 2016).

Na avaliação da atividade antioxidante das soluções nas concentrações de 500, 250, 200, 100, 50, 25 e 5µg/mL, apenas na concentração mais alta (500 µg/mL) foi possível observar uma discreta atividade antioxidante do OEAz de 1,65 % AAO. Tal efeito pouco expressivo não permitiu o levantamento estatístico para a avaliação da atividade antioxidante das diferentes concentrações do OEAZ. Semelhante aos resultados encontrados na literatura, a faixa de concentrações aplicada (5–500 µg/mL), os terpenos estudados não apresentaram atividade antioxidante expressiva medida pelo método de eliminação do DPPH. (Yang *et al.*, 2010; Paduch *et al.*, 2016)

As formulações desenvolvidas são para aplicação tópica na pele; portanto, estudos de citotoxicidade foram realizados com células da pele. Os estudos com cultura de fibroblasto dérmico humano, ATCC® PCS-201-012 ™, foram escolhidos por serem células cutâneas sensíveis em relação às formulações de administração tópica (Marques *et al.*, 2018). Além disso, o queratinócito é um dos principais componentes do tecido de granulação, barreira epitelial e células dominantes no mecanismo de fechamento da ferida (Muniandy *et al.*, 2018). As amostras testadas por MTT foram apenas o OEAz e o gel sem OEAz, pois não é viável testar a formulação semissólida com OEAz diretamente nas células nestes ensaios, pois causaria morte celular por oclusão. Dessa forma, a formulação foi diluida no meio de cultura com o objetivo de reduzir a concentração do óleo, a qual já entra na formulação na proporção µg/g. Assim, o óleo puro foi avaliado em diferentes concentrações: 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 mg/ml em diluições no meio de cultura de células. Foi observado que em concentrações menores ou iguais a 0,25 mg/mL, o OEAz não apresentou citotoxicidade. Portanto, essa concentração corrobora os relatos sobre a baixa toxicidade do OEAz (Mendonça *et al.*, 1991) e, por isso foi utilizada no ensaio de

cicatrização, visando manter a integridade celular durante o teste (ausência de efeito citotóxico), conforme mostrado na figura 2.

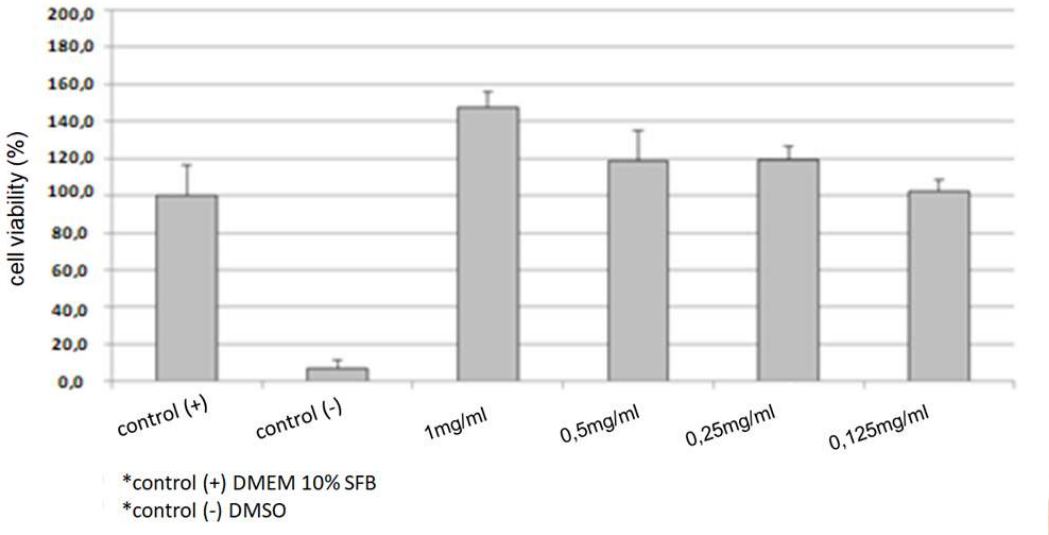
Figura 2. Ensaio de citotoxicidade MTT em queratinócitos epidérmicos HaCaT no óleo essencial de Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm.



Fonte: Adaptada de Santos, 2022, p.64

Para formulação a sem EOAz (base) foi possível fazer diluições em meio de cultura em concentrações variando de 125 a 1000 µg / mL, conforme mostrado na figura 3. A maior concentração não demonstrou efeito citotóxico para as células. Não foi possível diluir efetivamente a formulação em concentrações mais elevadas, o que não permite a investigação do efeito citotóxico em maiores proporções.

Figura 3. Ensaio de citotoxicidade MTT em queratinócitos epidérmicos HaCaT naformulação sem o óleo essencial de Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm.



Fonte: Adaptada de Santos, 2022, p.65

Após o preparo da formulação do gel com o óleo de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. na concentração de 0,250 mg/ mL e da formulação do gel completada com água não foi observada diferença significativa entre as formulações em relação a textura, a aparência e a coloração, conforme apresentado na figura 4. Entretanto, o odor característico do óleo das folhas da espécie se manteve marcante na formulação.

Figura 4. Formulação do gel sem (à esquerda) e com (à direita) o óleo de Alpinia zerumbet (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. na concentração de 0,25 mg/ mL.



Fonte: Adaptada de Santos, 2022, p.5

Foi observado pelo ensaio por MTT, conforme já relatado na literatura, que a concentração de OEAz de 250 µg/mL não apresenta citotoxicidade. Além disso, não foram observadas alterações

significativas nas características organolétpticas (aspecto e cor) e fisico-químicas entre as formulações com e sem o OEAz nessa concentração, a não ser o odor característico do OEAz e a diferença entre a viscosidade do gel com e sem o OEAz, 25833cP e 21766cP, respectivamente.

Foi observado pelo ensaio por MTT, conforme já relatado na literatura, que a concentração de OEAz de 250 µg/mL não apresenta citotoxicidade. Além disso, não foram observadas alterações significativas nas características organolétpticas (aspecto e cor) e fisico-químicas entre as formulações com e sem o OEAz nessa concentração, a não ser o odor característico do OEAz e a diferença entre a viscosidade do gel com e sem o OEAz, 25833cP e 21766cP, respectivamente. Dessa forma, foi realizado o estudo de estabilidade do gel creme contendo 250 µg/mL do OEAz.

Com relação a avaliação visual do gel creme contendo o OEAz a 250µg/mL, foi observada uma emulsão viscosa, isenta de impureza, de cor branca a levemente amarelada e com um odor característico do OEAz.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em nenhum ponto da estabilidade nos ensaios de densidade, indicando que a formulação contendo OEAz apresenta densidade sem alteração durante 90 dias independente da condição de armazenamento.

Nos ensaios de pH, o T0 apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a todos os pontos de estabilidade armazenados a temperatura ambiente (TA30, TA60, TA90) e aos pontos de 60 dias de estabilidade armazenados em estufa (TE60) e em geladeira (TG60). O ponto TA30 apresentou diferença estatística ($p<0,05$) em relação a todos os pontos de 90 dias nas três condições de armazenamento (TA90, TE90, TG90) e ao ponto de 30 dias em geladeira (TG30). O ponto TA60 apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos pontos TE60 e TE90. Já o ponto TA90 apresento diferença estatística em relação aos tempos TE30, TE90, TG30 e TG90. O ponto TE30 apresentou diferença quando comparado a 60 dias de estabilidade (TE60 e TG60). O ponto TE60 apresentou diferença quando comparado aos pontos TE90, TG30 e TG90, enquanto que o ponto TE90 apresentou diferença em relação ao TG60. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre as amostras acondicionadas em geladeira (TG30, TG60 e TG90). Apesar de alguns tempos apresentarem diferença estatisticamente significativa, todos os valores de pH encontrados estão entre 5.1-5.5, a qual é ideal para formulações tópicas (Alves *et al.*, 2020), visto que faixa de pH que se encontra dentro da faixa de pH da pele, levemente cido de 4,6 – 5,8 (Leonardi *et al.* 2002). Assim, espera-se que a formulação não seja irritante por alcalinização ou perturbe o manto ácido da pele.

Nos ensaios de viscosidade, os pontos T0, TA30, TA60 e TA90 apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p< 0,05$) em relação aos pontos de 30 e 90 dias armazenados em geladeira e estufa (TG30, TG90, TE30 e TE90). Já o ponto TE30 apresentou diferença estatística em relação ao TE60 e o ponto TE60 diferença em relação ao TE90. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre as amostras acondicionadas em geladeira (TG30, TG60 e TG90). Através dessas análises, pode se verificar que a viscosidade se mantém inalterada quando a formulação é armazenada em temperatura ambiente ou em geladeira, mas apresenta uma variação quando a formulação é acondicionada em estufa.

A viscosidade de uma formulação depende de suas características físico-químicas e das condições de temperatura a que está submetida (Isaac *et al.*, 2008). Este parâmetro ajuda a avaliar a consistência e fluidez adequadas, além de indicar o desempenho do produto ao longo do tempo (ANVISA, 2004).

De acordo com Bolla *et al.* (2020), as formulações de gel apresentam maiores variações de viscosidade em relação a outras formulações e que essas variações são esperadas, uma vez que a viscosidade é diretamente influenciada pelas variações de temperatura. (Mariotti; Frasson, 2011).

Temperaturas elevadas, por exemplo, podem acelerar reações químicas, alterando a atividade dos componentes, viscosidade, aparência, cor e odor da formulação. Assim, uma avaliação físico-química é necessária, pois as mudanças na estrutura da formulação às vezes não são visualmente perceptíveis (ANVISA, 2004; Mariotti; Frasson, 2011).

Baseado nos resultados encontrados, pode-se sugerir que o gel creme contendo OEAz apresenta estabilidade nas três condições de armazenamento avaliadas por 90 dias. Novos estudos de estabilidade a longo prazo devem ser realizados visando determinar o prazo de validade da formulação, seguindo o guia de estabilidade de cosméticos (ANVISA, 2004).

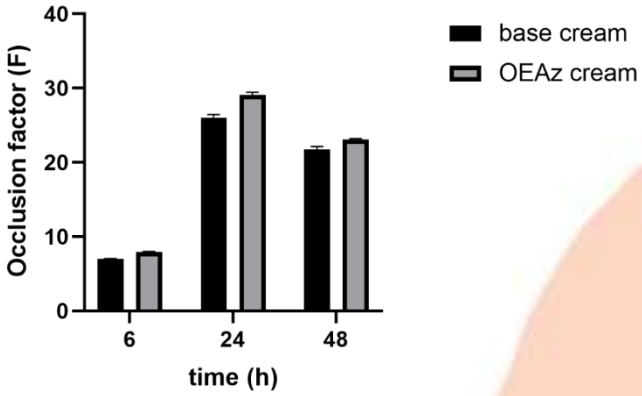
O fator de oclusão (F) é um parâmetro que avalia a capacidade da formulação de formar uma barreira na pele, promovendo uma redução da evaporação da água e a manutenção da hidratação da pele. Fator de Oclusão depende do volume da amostra, tamanho da partícula, cristalinidade, concentração de lipídios e tipo de coloidais sistemas. Este fator varia de zero, efeito não oclusivo, a 100, que é a oclusividade máxima. (Müller *et al.*, 2007; Wissing; Lippacher; Müller, 2001).

Conforme apresentado graficamente (Figura 5), o creme base (formulação sem o OEAz) apresentou um fator de oclusão de 7, 26 e 22F às 6, 24 e 48 h, respectivamente. Já o creme composto (formulação contendo o OEAz) mostrou um fator de oclusão 8, 29 e 23F em 6, 24 e 48 h,

respectivamente. Conseqüentemente, o fator de oclusão de ambas as formulações foi semelhante às 6, 24 e 48 h e não houve diferenças estatísticas entre elas ($p > 0,05$). Um valor F zero (fator de oclusão) significa que nenhum efeito oclusivo em comparação com a referência foi observado, enquanto um valor F de 100 indica o máximo de oclusividade da formulação.

Ambas as formulações apresentaram uma baixa ação oclusiva; esse resultado é esperado uma vez que ambas as formulações são à base de gel aquoso, com baixo percentual de conteúdo lipofílico, que geralmente é responsável pelo efeito oclusivo. Além disso, a presença do OEAz não alterou o fator de oclusão da formulação do creme composto. Wissing *et al.* (2001) observaram que partículas com tamanho em torno de 3 µm podem diminuir o fator de oclusão abaixo de 15, uma vez que partículas grandes tendem a aumentar o tamanho dos poros no filme formado e facilitar a evaporação da água.

Figura 5. Representação gráfica do fator de oclusão da formulação sem o OEAz (creme base) e da formulação contendo o OEAz (creme composto) às 6h, 24h e 48h.



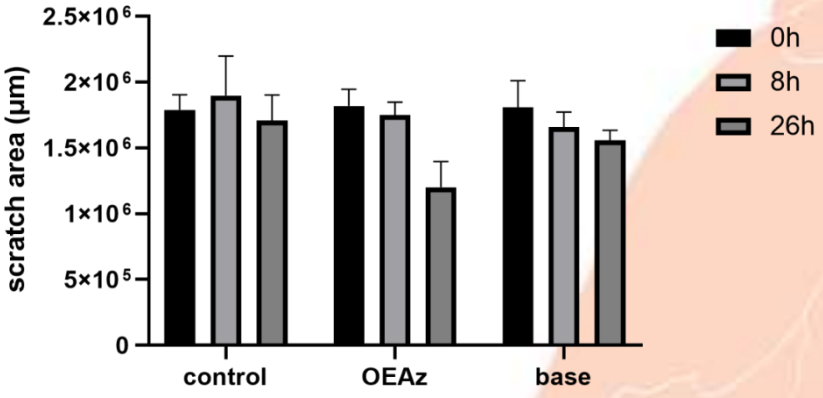
Fonte: Adaptada de Santos, 2022, p.63

A formulação ajuda a reduzir a penetração do OEAz em toda a pele. Alguns óleos essenciais podem apresentar irritação sobre a pele (Hammer *et al.*, 1999; Rubel *et al.*, 1998; Yap *et al.*, 2021). Portanto, uma formulação com baixo efeito oclusivo é desejável (Klimová; Hojerová; Beránková, 2015; Rodrígues-Gómez *et al.*, 2015; Zhang *et al.* 2013).

O teste para determinar o efeito oclusivo permitiu verificar a capacidade da formulação em manter a hidratação da pele. A aplicação de produtos oclusivos forma uma película na pele e evita a evaporação da água para a atmosfera. A água é, portanto, retida na pele (Teeranachaideekul *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2018).

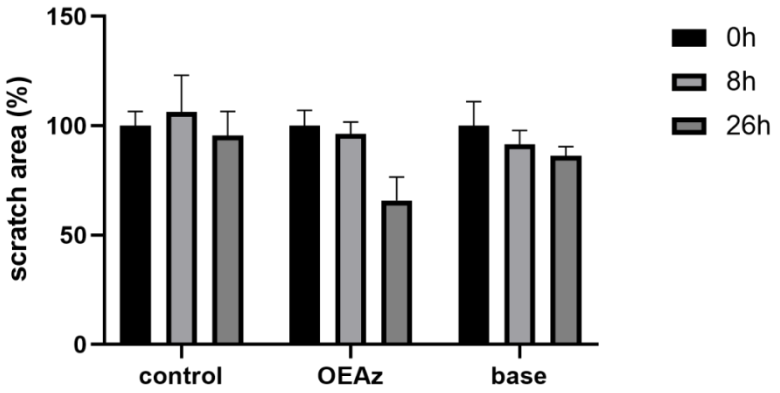
O teste de migração através de um risco foi realizado para observar o potencial de cicatrização de feridas de membranas. Como o OEAz puro em concentrações menores ou iguais a 0,25 mg / mL não apresentou citotoxicidade, essa concentração (0,25 mg / mL) foi utilizada no teste de migração para o DMEM (controle), para o branco (formulação sem o OEAz) e para o OEAz puro diluídos no meio de cultura. Comparando os tempos 0 h, 8h e 26 h, as células HaCat tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) na área de arranhão em ambas as representações gráficas (Figuras 6 e 7) e migraram em direção a esta área na presença do OEAz (Figura 8). Comparativamente, o DMEM (controle) não apresentou variação (quantitativa ou visual) na ocupação da área de risco, ao contrário do efeito de migração observado para o OEAz puro. Este resultado sugeriu que a presença do OEAz na formulação poderia efetivamente melhorar a ferida. A outra membrana contendo o formulação sem o OEAz (Base) não mostrou diferença estatística significativa entre a migração de células HaCat em direção à área de arranhão após 26 h em ambas as representações gráficas (Figuras 6, 7 e 8).

Figura 6. Representação gráfica de comparação da área (µm) de arranhão em todos os grupos experimentais no ensaio de migração celular usando queratinócitos humanos HaCaT.



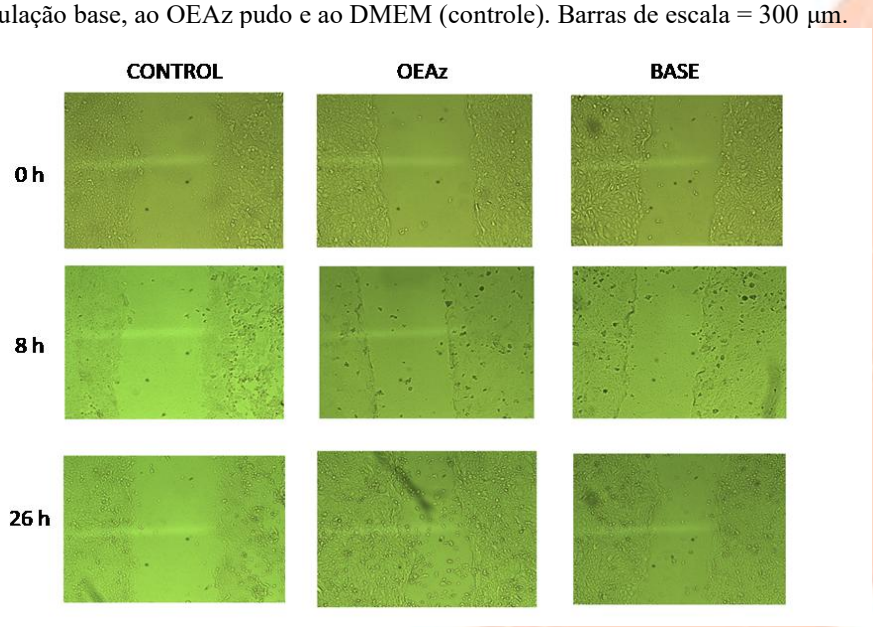
Fonte: Adaptada de Santos, 2022, p.66

Figura 7. Representação gráfica da porcentagem de área de arranhão em todos os grupos experimentais no ensaio de migração celular usando queratinócitos humanos HaCaT.



Fonte: Adaptada de Santos, 2022, p.66

Figura 8. Imagens de ensaio de raspagem de células HaCaT tratadas com os diferentes meios de cultura submetidos à formulação base, ao OEAz pudo e ao DMEM (controle). Barras de escala = 300 μm.



Fonte: Adaptada de Santos, 2022, p.63

O desempenho da membrana contendo o OEAz foi bem-sucedido em relação à formulação base, o qual não diferiu do grupo controle em relação às suas características, como o diâmetro em nanoescala de fibras; a alta porosidade; sua estrutura amorfa e baixa citotoxicidade. Pesquisas anteriores descreveram que o óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm acelerou o processo de cura por um aumento no número de fibroblastos, vasos sanguíneos, e deposição de colágeno nas feridas. O OEAz também aumentou o recrutamento de células inflamatórias para o local da ferida e mostrou uma redução efetiva do processo inflamatório mediada pelos monoterpenos

presentes no OEAz e um aumento de macrófagos e fibroblastos, recrutados para iniciar a síntese de colágeno e promover a reparação dos tendões de ratos, além de aumentar a absorção transdérmica pela interação com lipídios e queratina permitindo maior solubilidade de outras substâncias (Junior *et al.*, 2017). Dessa forma, é possível observar que o OEAz contribui para o processo de migração celular e consequente reparação tecidual.

4 CONCLUSÃO

Considerando o aumento da busca por produtos rejuvenescedores, o interesse em estudos sobre formulações que promovam reparação tecidual e com ação oclusiva efetiva tem sido mais frequente. Além disso, no contexto de meio ambiente e de saúde, substâncias naturais têm sido cada vez mais incorporadas em formulações dermocosméticas. Neste trabalho, foi apresentado o desenvolvimento de uma formulação de gel e a avaliação da incorporação do OEAz na mesma. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* usando o OEAz em fibroblastos dérmicos primários não apresentou toxicidade. Conseqüentemente, o OEAz pode ser usado para formulações tópicas. A ação do gel contendo o OEAz foi efetiva nos ensaios de migração/ cicatrização e de oclusão. A formulação apresentou pH em torno de 5, o que é ideal para formulações tópicas e se apresentou estabilidade nas três condições de armazenamento avaliadas (ambiente, geladeira e estufa) por 90 dias. Portanto, apesar de a maior parte dos estudos e patentes sobre a aplicação da espécie *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm em dermocosméticos ser sobre extrato alcoolico, o OEAz apresentou resultados interessantes, sugerindo que o mesmo se torna um candidato potencial a ser incorporado em materiais ou produtos cosméticos inovadores.

REFERÊNCIAS

ALVES, P. E.; GOMES, A. C. G.; GOMES, A. K. C.; NIGRO, F.; KUSTER, R. M.; FREITAS, Z. M. F.; COUTINHO, C. S. C.; MONTEIRO, M. S. S. B.; SANTOS, E. P.; SIMAS, N. K. Development and Characterization of Phytocosmetic Formulations with Saccharum officinarum. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, p. 406-415, 2020.

ANVISA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1. ed. Brasília: **ANVISA**, v. 1, maio, 2004. p. 10-52

ANVISA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Agência Nacional De Vigilância Sanitária 2 Ed Brasília, Brasil, 2012. p. 1-59.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. Delineamento de Formas Farmacêuticas 4ª Ed, **Elsevier**, 2016. p. 855.

BARCELOS, F.F.; OLIVEIRA, M.L.; GIOVANINI, N.P.B.; LINS, T.P.; FILOMENO, C.A.; SCHNEIDER, S.Z.; PINTO, V.D.; ENDRINGER, D.C.; ANDRADE, T.U. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers) BLBurtt & RMSm em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 48-56, 2010.

BATISTA, J. S.; SALATINO, A.; NEGRI, G.; JARA, C. E. P.; DE PAIVA, K. A. R.; DOS SANTOS, W. L. A.; TEÓFILO, T. S.; FELIX, N. S.; SILVA, F. H. A.; RODRIGUES, V. H. V. Photoprotective activity of geopropolis produced by Melipona subnitida (Apidae, Meliponinae) in the semiarid of the Brazilian Northeast. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e11210212305, p. 1-15, 2021.

BOLLA, P. K.; CLARK, B. A.; JULURI, A.; CHERUVU, H. S.; RENUKUNTLA, J. Evaluation of Formulation Parameters on Permeation of Ibuprofen from Topical Formulations Using Strat-M Membrane. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 151, p. 1-19, 2020.

BRASIL. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012**. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos – RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 4 jul. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde e Anvisa. **Monografia das Espécies** *Alpinia speciosa* e *Alpinia zerumbet* (Galanga), p. 46, 2014.

BUCKS, D.; MAIBACH, H. I.; Occlusion Does Not Uniformly Enhance Penetration In Vivo. **Topical Absorption of Dermatological Products**, v. 155, p. 65 – 83, 2005.

CAMPOS, P. M. B. G. M.; MERCÚRIO, D. G. Formas Cosméticas (Série Fundamentos da Cosmetologia) **Cosmetics & Toiletries**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto SP, Brasil Mar/Abr 25, 2014. p. 36-39.

CARDOSO, I. C.; NAKAMURA, M. J.; CORREIA, V. G.; PEREIRA, H. M. G.; BEHRENS, M. D.; TAPPIN, M. R. R. Development, Optimization and Validation of a GC Method by Polarity Phase Constants and Statistical Design of Experiments for the Determination of Monoterpenes in *Alpinia zerumbet* Essential Oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 11, p. 2254-2265, 2018.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; SANTOS, R.C.; PEREIRA, A. M. L.; FOGAÇA, F. H. S.; CANUTO, K. M.; BRITO, E. S.; CALVET, R. M. Chemical composition and efficacy of essential oil and ethanol extract of *Alpinia zerumbet* on *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016.

COELHO, D. S.; CAMPOS, V. E. B. de; FREITAS, Z. M. F.; RICCI JÚNIOR, E.; CAARLS, M. B.; DIAZ, B. L.; SANTOS, E. P.; MONTEIRO, M. S. S. B. Development and characterization of nanoemulsion containing almond oil, biodegradable polymer and propranolol as potential treatment in hemangioma. ***Macromolecular Symposia***, v. 381, n. 1, e1800121, 2018.

CUNHA, G. H.; FECHINE, F. V.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; MORAES, M. E. A. Comparative study of the antihypertensive effects of hexane, chloroform and methanol fractions of essential oil of Alpinia zerumbet in Wistar rats. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 113–124, 2016.

FLUHR, J.; HOLLERAN, W. M.; BERARDESCA, E. Clinical effects of emollients on skin. In: LEYDEN, J. J.; RAWLINGS, A. V. (ed.). (Cosmetic Science and Technology Series) **Skin Moisturization**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 220–242.

GKOTSIS, G.; RICKARD, J. J. S.; BROOKER, A.; BAKALIS, S.; GROVER, L. M.; OPPENHEIMER, P. G. Fabrication of optimized skin biomimics for improved interfacial retention of cosmetic emulsions. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 15, n. 145, e20180332, 2018.

GONÇALVES, F. S.; GIOVANINI, I. R. T.; CERQUEIRA, C.; RICCI JÚNIOR, E.; FREITAS, Z. M. F.; SANTOS, E. P. dos. Multifunctional photoprotection: corrective makeup for cutaneous dyschromias. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 4, e17313, 2018.

GÜNDEL, S. S.; VELHO, M. C.; DIEFENTHALER, M. K.; FAVARIN, F. R.; COPETTI, P. M.; FOGAÇA, A. O.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; GÜNDEL, A.; SAGRILLO, M. R.; OURIQUE, A. F. Basil oil-nanoemulsions: development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 378–383, 2018.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985–990, 1999.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

JEZLER, C. N.; BATISTA, R. S.; ALVES, P. B.; SILVA, D. C.; COSTA, L. C. B. Histochemistry, content and chemical composition of essential oil in different organs of Alpinia zerumbet. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1811–1816, 2013.

JÚNIOR, L. S., et. al. Effects of the essential oil of Alpinia zerumbet (Pers) B.L. Burtt & R.M. Sm. on healing and tissue repair after partial Achilles tenotomy in rats. **Acta Cir Bras**, v.32, n. 6. p. 449-458, 2017.

KLIMOVÁ, Z.; HOJEROVÁ, J.; BERÁNKOVÁ, M. Skin absorption and human exposure estimation of three widely discussed UV filters in sunscreens – in vitro study mimicking real-life conditions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 237–250, 2015.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasive Study of pH variation on the skin using cosmetic formulation s with and without vitamins A, E or ceramide: by a non-invasive method. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 563-569, set./out. 2002.

LYNDE, C. W. Moisturizers: what they are and how they work. **Skin Therapy Letter**, v. 6, n. 13, p. 3–5, 2001.

MARIOTTI, D.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de formulações cosméticas contendo extrato etanólico dos frutos de *Fragaria vesca* L. (morango). **Infarma**, v. 23, n. 3/4, 2011.

MARQUES, T. Z. S.; OLIVEIRA, R. S.; SIQUEIRA, L. B. O.; CARDOSO, V. S.; FREITAS, Z. M. F.; BARROS, R. C. S. A.; VILLA, A. L. V.; MONTEIRO, M. S. S. B.; SANTOS, E. P.; RICCI JÚNIOR, E. Development and characterization of a nanoemulsion containing propranolol for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 2827–2837, 2018.

MENDONÇA, V. L. M.; OLIVEIRA, C. L. A.; CRAVEIRO, A. A.; RAO, V. S.; FONTELES, M. C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, supl. 2, p. 93–97, 1991.

MONTENEGRO, L.; RAPISARDA, L.; MINISTERI, C.; PUGLISI, G. Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E. **Cosmetics**, v. 2, n. 1, p. 35–47, 2015.

MUNIANDY, K.; GOTHAI, S.; TAN, W. S.; KUMAR, S. S.; ESA, N. M.; CHANDRAMOHAN, G.; AL-NUMAIR, K. S.; ARULSELVAN, P. In vitro wound healing potential of stem extract of *Alternanthera sessilis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, e3142073, p. 1–13, 2018.

MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 522–530, 2007.

PADUCH, R.; TRYTEK, M.; KRÓL, S. K.; KUD, J.; FRANT, M.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; FIEDUREK, J. Biological activity of terpene compounds produced by biotechnological methods. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1096–1107, 2016.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R.; GÓMEZ, A. Z.; GARCÍA, N. D.; NAVALÓN, A. Determination of benzophenone-UV filters in human milk samples using ultrasound-assisted extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by UHPLC-MS/MS analysis. **Talanta**, v. 134, p. 657–664, 2015.

RUBEL, D. M.; FREEMAN, S.; SOUTHWELL, I. A. Tea tree oil allergy: what is the offending agent? Report of three cases of tea tree oil allergy and review of the literature. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 39, n. 4, p. 244–247, 1998.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. An abridged version of The principles of humane experimental technique. In: BALLS, M. **The three Rs and the humanity criterion: reduction, refinement, replacement**. Nottingham: FRAME, 2009. p. 1–111.

SALAS-OROPEZA, J.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; PÉREZ-TORRES, A.; CASTELL-RODRÍGUEZ, A. E.; BECERRIL-MILLÁN, R.; RODRÍGUEZ-MONROY, M. A.; CANALES-MARTÍNEZ, M. M. Wound healing activity of the essential oil of *Bursera morelensis* in mice. **Molecules**, v. 25, n. 8, e1795, 2020.

SANTANA, I. C. de J.; CÂNDIDO, L. P. M.; FILHO, R. N. P.; CÂNDIDO, E. A. F. Avaliação do uso do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) em atividade regeneradora do envelhecimento induzido por radiação UVA/UVB em modelo murino. In: SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, 18, 2016, Aracaju. **Anais da SEMPESq**. Aracaju: Universidade Tiradentes, 2016. p. 1–4.

SANTOS, Â. C. P. B. dos; Desenvolvimento de gel creme para regeneração cutânea contendo óleo essencial de A*lpinia zerumbet* (pers.) B. L. Burtt & r. M. Sm. Dissertação ((Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

SINGH, V. K. Keeping with Tradition. **Cosmetics& Toiletries**, v. 134, n. 7, p. 63,67, jul./ago. 2019.
TEERANACHAIDEEKUL, V.; BOONME, P.; SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H.; Junyaprasert, V. B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NCL. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 2, p. 134-141, 2008.

TU, P. T. B.; TAWATA, S.; Anti-Oxidant, Anti-Aging, and Anti-Melanogenic Properties of the Essential Oils from Two Varieties of *Alpinia zerumbet*. **Molecules**, v. 20, p. 16723-16740, 2015.
WINKELMAN, W. J. Aromatherapy, botanicals, and essential oils in acne. **Clinics in Dermatology**, v. 36, n. 3, p. 299–305, 2018.

WISSING, S.A.; LIPPACHER, A.; MÜLLER, R.H. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Cosmetic Science**, v. 52, p. 313-324, 2001.

YANG, S. A.; JEON, S. K.; LEE, E. J.; SHIM, C. H.; LEE, I. S. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. **Natural Product Research**, v. 24, n. 2, p. 140–151, 2010.

YAP, P. S. X.; YUSOFF, K.; LIM, S. H. E.; CHONG, C. M.; LAI, K. S. Membrane disruption properties of essential oils—A double-edged sword? **Processes**, v. 9, n. 4, e595, 2021.
ZHANG, T.; SUN, H.; QIN, X.; WU, Q.; ZHANG, Y.; MA, J. Benzophenone-type UV filters in urine and blood from children, adults, and pregnant women in China: partitioning between blood and urine as well as maternal and fetal cord blood. **Science of the Total Environment**, v. 461–462, p. 49–55, 2013

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, n. 6, p. 411–414, 1999.