

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIA SALLES GAVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOEMULSÃO CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE
*Ocimum gratissimum***

VILA VELHA
2025

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOEMULSÃO CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE**
Ocimum gratissimum

Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para obtenção do grau de
Mestra em Ciências Farmacêuticas.

JULIA SALLES GAVA

VILA VELHA
2025

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

G281d

Gava, Julia Salles.

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão contendo o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* / Julia Salles Gava . – 2025.

73 f. : il.

Orientador: Marcio Fronza.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2025.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Essências e óleos essenciais.
I. Fronza, Marcio. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

JULIA SALLES GAVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOEMULSÃO CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE
*Ocimum gratissimum***

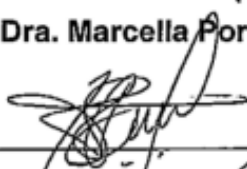
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2025,

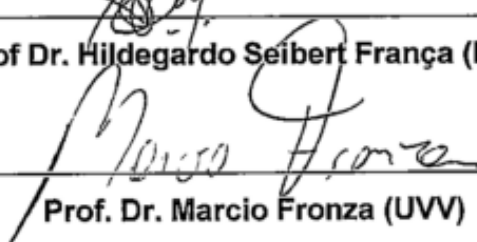
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Marcella Porto Tavares (IFES)



Prof. Dr. Hildegardo Seibert França (IFES)



Prof. Dr. Marcio Fronza (UVV)

Orientador

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - Ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)
ANOVA - Análise de Variância Multifatorial
AK - Ácido kójico
BrdU - 5-bromo-2-deoxiuridina
CAT - Catalase
CPZ - Clorpromazina
DLS - Espalhamento dinâmico de luz
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DP - Desvio padrão
DMEM - Dubelcco modified Eagle medium
GC/MS - Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
IC₅₀ - Concentração Inibitória 50%
IL-1 - Interleucina-1
IL-6 - Interleucina-6
IL-10 - Interleucina-10
iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível
LPS - Lipopolissacarídeo
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio
nm - Nanômetro
NRU - Neutral Red Uptake
NO - Óxido Nítrico
NG - Nanoemulsão do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*
OG - Óleo essencial de *Ocimum gratissimum*
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
SFB - Soro fetal bovino
SDS - Lauril sulfato de sódio
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α
 μ M – Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Óleos essenciais	12
1.1.1. Atividade antioxidante	14
1.1.2. Atividade anti-inflamatória	15
1.1.3. <i>Ocimum gratissimum</i>	17
1.2. Nanotecnologia	19
1.2.1. Nanoemulsões	20
1.3. Avaliação da segurança de ingredientes cosméticos	23
1.3.1. Métodos alternativos para avaliação da segurança de ingredientes cosméticos.....	24
1.4. Hipótese	26
OBJETIVO GERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1. Materiais	27
2.2. Caracterização química do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).....	27
2.3. Preparação das nanoemulsões	28
2.4. Caracterização das nanoemulsões	30
2.4.1. Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta.....	30
2.5. Determinação da atividade antioxidante química.....	30
2.5.1. Ensaio de ABTS	30
2.5.2. Ensaio de DPPH	31
2.6. Cultivo das linhagens celulares	31
2.7. Ensaio de viabilidade celular	31
2.7.1. Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i> (MTT).....	31
2.7.2. Citotoxicidade pelo método de vermelho neutro (NRU).....	32
2.8. Determinação da atividade antioxidante intracelular <i>in vitro</i>	32
2.8.1. Efeito preventivo contra o dano oxidativo <i>in vitro</i> por H ₂ O ₂	32
2.8.2. Determinação indireta <i>in vitro</i> de óxido nítrico	33
2.8.3. Redução da produção do ânion superóxido.....	33
2.9. Determinação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	34
2.9.1. Determinação <i>in vitro</i> de citocinas.....	34
2.10. Atividade proliferativa celular (BrdU)	34
2.11. Migração celular (<i>Scratch assay</i>)	34
2.12. Ensaio da inibição da tirosinase	35

2.13.	Métodos alternativos de segurança <i>in vitro</i> ao uso de animais	35
2.13.1.	Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio HET-CAM	35
2.13.2.	Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio CAM-TBS.....	37
2.13.3.	Teste de fotohemólise em glóbulos vermelhos (Photo-RBC).....	38
2.13.4.	Teste de fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU (OECD TG 432)	39
3.14.	Análise estatística dos dados	40
3.	RESULTADOS.....	41
3.1.	Composição química do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i>	41
3.2.	Preparação da nanoemulsão.....	43
3.3.	Avaliação da estabilidade físico-química sob efeito da temperatura.....	44
3.4.	Atividade antioxidante	45
3.5.	Ensaio de viabilidade celular	45
3.6.	Efeitos sobre a viabilidade de fibroblastos, macrófagos e queratinócitos ..	45
3.7.	Determinação da atividade antioxidante intracelular <i>in vitro</i>	45
3.7.1.	Efeito preventivo contra danos oxidativos <i>in vitro</i> causados por H ₂ O ₂	45
3.7.2.	Determinação indireta de óxido nítrico	46
3.7.3.	Redução da produção do ânion superóxido.....	47
3.8.	Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	48
3.8.1.	Determinação de citocinas.....	48
3.9.	Atividade proliferativa celular (BrdU)	51
3.10.	Ensaio de migração celular (<i>Scratch assay</i>).....	52
3.11.	Ensaio da inibição da tirosinase	53
3.12.	Métodos alternativos de segurança <i>in vitro</i> ao uso de animais	54
3.12.1.	Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio de HET-CAM	54
3.12.2.	Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio CAM-TBS.....	55
3.12.3.	Teste de fotohemólise em glóbulos vermelhos (Photo-RBC).....	56
3.12.4.	Efeitos da fototoxicidade da nanoemulsão sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3	57
4.	DISCUSSÃO	58
5.	CONCLUSÃO	63
6.	REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas de <i>Ocimum gratissimum</i>	18
Figura 2. Representação esquemática de gotícula de nanoemulsão O/A.	21
Figura 3. Fluxograma da formulação da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i>	29
Figura 4. Membrana cório-alantoide do ovo exposta previamente ao início do ensaio	36
Figura 5. Fluxograma ilustrativo do teste de fototoxicidade in vitro com fibroblastos 3T3 utilizando o ensaio de absorção de vermelho neutro (NRU).	40
Figura 6. Cromatograma do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> , do tempo 0 a 20 min (A) e do tempo 20 a 42 min (B).	41
Figura 7. Imagem da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> com EHL 15..	43
Figura 8. Imagem da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> a 1%.....	44
Figura 9. Efeito protetor de nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> (NG) e óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OG) avaliado em macrófagos contra o dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂). Os resultados são expressos como média ± DP. *(p < 0,05) indica diferenças significativas em relação ao grupo controle sem H ₂ O ₂	46
Figura 10. Efeitos inibitórios da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> (NG) e do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OG) sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 µg/mL após 24h de tratamento. A concentração de nitrito reflete a quantidade de óxido nítrico gerado pelas células RAW 264.7. L-Name 10µM foi usado como controle positivo. Os resultados são expressos como média ± DP. *(p < 0,05) indica diferenças significativas em comparação com as células tratadas com LPS.	47
Figura 11. Efeitos inibitórios da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> (NG) e do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OG) sobre a produção do ânion superóxido em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 µg/mL. L-Name 10 µM foi usado como controle positivo. Os resultados são expressos como média ± DP. *(p < 0,05) indica diferenças significativas em comparação com as células estimuladas com LPS.....	48
Figura 12. Efeito da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> (NG) e óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OG) nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL sobre a concentração da citocina pró-inflamatórias IL-6 em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 µg/mL após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média ± DP. Significância estatística para p < 0,05. (#) Grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. (*) Grupo tratado comparado ao grupo LPS.	49

Figura 13. Efeito da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL sobre a concentração da citocina pró-inflamatórias TNF-α em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 µg/mL após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média ± DP. Significância estatística para $p < 0,05$. (#) Grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. (*) Grupo tratado comparado ao grupo LPS. 50

Figura 14. Efeito da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL sobre a concentração da citocina pró-inflamatórias IL-1 em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 µg/mL após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média ± DP. Significância estatística para $p < 0,05$. (#) Grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. (*) Grupo tratado comparado ao grupo LPS. 51

Figura 15. Efeito proliferativo em cultura de fibroblastos avaliado pelo ensaio BrdU da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) nas concentrações de 2,5 a 20 µg/mL. Os valores são expressos como média ± DP. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (CTL) ($p < 0,05$). 52

Figura 16. Imagens representativas dos efeitos sobre a migração celular de fibroblastos pela nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) (20 µg/mL) após 16 horas comparada ao controle no tempo 0h. 53

Figura 17. Percentual de inibição da atividade da tirosinase pelo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) em diferentes concentrações (10, 1 e 0,1 µg/mL) comparado ao ácido kójico (AK 125 µg/mL, controle positivo). 54

Figura 18. Imagens representativas dos efeitos na membrana cório-alantóide (HET-CAM) após tratamento com diferentes controles. CAM: membrana sem tratamento (controle negativo); SF 0,9%: solução fisiológica (controle negativo); SDS 1%: lauril sulfato de sódio a 1% (controle positivo irritante); NaOH 0,1N: solução de hidróxido de sódio a 0,1N (controle positivo irritante). Os sinais observados incluem (*) hiperemia, (**) hemorragia e (***) coagulação. 55

Figura 19. Efeito hemolítico da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) sob exposição (barras cinzas) e ausência de exposição (barras brancas) à radiação UVA (4 J/cm²). A avaliação de hemólise foi conduzida para NG (30 µg/mL), nanoemulsão sem óleo essencial (NG branco), água destilada (H₂O, controle positivo) e clorpromazina (CPZ, 60 µg/mL, controle positivo). Resultados apresentados como média ± DP de experimentos realizados em triplicata. Análise estatística conduzida por ANOVA seguida de teste de Tukey. 57

Figura 20. Efeito fototóxico da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) em fibroblastos 3T3 com e sem exposição à radiação UVA (4 J/cm²). A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de vermelho neutro (NRU) após tratamento com NG em diferentes concentrações (1 e 10 µg/mL). Resultados expressos como média ± DP de experimentos realizados em triplicata. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 min.	37
Tabela 2. Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM.	37
Tabela 3. Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio CAM-TBS.....	38
Tabela 4. Composição química do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> . T_r = tempo de retenção (min); $I_{r_{calc}}$ = índice de retenção calculado; $I_{r_{lit}}$ = índice de retenção da literatura; % área = concentração relativa de cada composto em relação à área total do cromatograma.....	42
Tabela 5. Análise do tamanho da partícula (nm), potencial Zeta (mV) e índice de polidispersidade (PDI) da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> durante 60 dias (D0 a D60) determinado pelo DLS nas temperaturas de 4°C, 25°C e 45°C. Valores correspondem à média de 3 repetições $\pm$ desvio padrão da média ..	44
Tabela 6. Atividade antioxidante determinada pelo teste do ABTS e DPPH da nanoemulsão do <i>Ocimum gratissimum</i> (NG) e do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> (OG) expressos em IR_{50} . Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras distintas (a, b, c, d) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$).	45
Tabela 7. Efeitos da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> sobre o potencial de irritação ocular pelo ensaio de HET-CAM classificados quanto ao IS (irritation score).	55
Tabela 8. Efeitos da nanoemulsão de <i>Ocimum gratissimum</i> (NG) sobre o potencial de irritação ocular pelo ensaio de CAM-TBS.	56

RESUMO

GAVA, JULIA SALLES, M.Sc, Universidade Vila Velha - ES, fevereiro de 2025. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão contendo o óleo essencial de *Ocimum gratissimum***. Orientador: Prof. Dr. Marcio Fronza.

O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, sendo promissor para aplicações cosméticas e terapêuticas. Contudo, sua baixa solubilidade e estabilidade em meios aquosos limitam seu uso em preparações cosméticas, sendo as nanoemulsões uma estratégia para melhorar sua biodisponibilidade e potencializar seus efeitos. Este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão contendo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (NG), avaliando sua estabilidade, segurança e eficácia biológica. A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) identificou β -ocimeno, eugenol e germacreno D como compostos majoritários do OG. A NG foi obtida pelo método de baixa energia, apresentando tamanho médio de partícula na faixa nanométrica, índice de polidispersão (PDI) inferior a 0,3 e potencial Zeta negativo, indicando boa estabilidade coloidal. A estabilidade físico-química foi monitorada por 60 dias sob diferentes condições de armazenamento (4°C, 25°C e 45°C), sendo 4°C a temperatura mais favorável, com aumento progressivo e controlado das partículas. A atividade antioxidante, avaliada pelos ensaios de ABTS e DPPH, mostrou que a NG preservou a atividade antioxidante do OG. As atividades antioxidante intracelular e anti-inflamatória *in vitro* foram avaliadas pela inibição do óxido nítrico, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, e pela supressão da produção de citocinas em cultura de macrófagos. Tanto NG quanto OG reduziram os níveis de superóxido, peróxido e óxido nítrico, mantendo o efeito antioxidante. A NG reduziu significativamente os níveis de TNF- α , IL-6, IL-1, enquanto o OG reduziu apenas TNF- α . Em cultura de fibroblastos *in vitro*, tanto a NG quanto o OG estimularam a proliferação de fibroblastos, evidenciada pelo ensaio de BrdU, e promoveram a migração celular no ensaio de *Scratch assay*, sugerindo efeito benéfico no reparo tecidual cutâneo. Os ensaios de segurança mostraram que a NG teve irritabilidade baixa (score médio de 4,1) no ensaio CAM-TBS e moderada no HET-CAM (score médio de 9,2). A avaliação de fotohemólise indicou baixa toxicidade para eritrócitos e ausência de fototoxicidade em fibroblastos 3T3, reforçando a segurança da nanoemulsão frente à exposição à luz. Conclui-se que a NG preservou ou potencializou a atividade biológica do OG e apresentou um perfil de segurança favorável. Este estudo reforça o potencial da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* para aplicações cosméticas e terapêuticas, destacando a necessidade de estudos adicionais em modelos *in vivo* e avaliações de estabilidade a longo prazo.

Palavras-chave: nanoemulsão; *Ocimum gratissimum*; potencial cicatrizante; anti-inflamatória.

ABSTRACT

GAVA, JULIA SALLES, M.Sc, Universidade Vila Velha - ES, February 2025.
Development and characterization of a nanoemulsion containing *Ocimum gratissimum* essential oil. Advisor: Prof. Dr. Marcio Fronza.

The essential oil of *Ocimum gratissimum* (OG) has antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties, making it promising for cosmetic and therapeutic applications. However, its low solubility and stability in aqueous media limit its use in cosmetic formulations, with nanoemulsions serving as a strategy to improve its bioavailability and enhance its effects. This study aimed to develop and characterize a nanoemulsion containing *Ocimum gratissimum* essential oil (NG), evaluating its stability, safety, and biological efficacy. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis identified β -ocimene, eugenol, and germacrene D as the major compounds of OG. NG was obtained using the low-energy method, exhibiting an average particle size within the nanometric range, a polydispersity index (PDI) lower than 0.3, and a negative Zeta potential, indicating good colloidal stability. The physicochemical stability was monitored for 60 days under different storage conditions (4°C, 25°C, and 45°C), with 4°C being the most favorable temperature, showing a controlled and progressive increase in particle size. The antioxidant activity, assessed by ABTS and DPPH assays, showed that NG preserved the antioxidant activity of OG. Intracellular antioxidant and anti-inflammatory activities were evaluated by inhibition of nitric oxide, superoxide anion, and hydrogen peroxide, and by suppression of cytokine production in macrophage cultures. Both NG and OG reduced superoxide, peroxide, and nitric oxide levels, maintaining antioxidant effects. NG significantly reduced TNF- α , IL-6, IL-1, while OG reduced only TNF- α . In vitro fibroblast culture, both NG and OG stimulated fibroblast proliferation, as shown by the BrdU assay, and promoted cell migration in the Scratch assay, suggesting a beneficial effect on skin tissue repair. Safety assays showed that NG had low irritability (mean score of 4.1) in the CAM-TBS test and moderate irritability in the HET-CAM test (mean score of 9.2). The photohemolysis evaluation indicated low toxicity to erythrocytes and no phototoxicity in 3T3 fibroblasts, reinforcing the safety of the nanoemulsion upon light exposure. It is concluded that NG preserved or enhanced the biological activity of OG and exhibited a favorable safety profile. This study highlights the potential of *Ocimum gratissimum* nanoemulsion for cosmetic and therapeutic applications, emphasizing the need for further studies in in vivo models and long-term stability evaluations.

Keywords: nanoemulsion; *Ocimum gratissimum*; wound healing potential; anti-inflammatory.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óleos essenciais

Desde os primórdios da civilização, as plantas têm sido utilizadas para alimentação e tratamento de doenças, com registros históricos datando de 60.000 a.C. Esse conhecimento tradicional impulsionou pesquisas científicas para identificar e caracterizar compostos bioativos, ampliando sua aplicação terapêutica. As plantas medicinais são amplamente reconhecidas por seu potencial farmacológico, pois contêm substâncias bioativas derivadas do metabolismo secundário, sendo amplamente empregadas como princípios ativos em medicamentos e essenciais para o metabolismo humano (Silva et al., 2018; da Rocha et al., 2021).

Entre os metabólitos secundários das plantas aromáticas, os óleos essenciais (OEs) se destacam como misturas complexas de compostos voláteis e lipofílicos, extraídos de diferentes partes vegetais, incluindo folhas, flores, caules, sementes e raízes. Com uma composição complexa que pode abranger de 20 a 60 componentes em proporções variáveis, esses compostos químicos desempenham um papel fundamental na defesa da planta contra patógenos e predadores (de Matos et al., 2019; Cimino et al., 2021) e, além de suas funções na planta, também desempenha papéis significantes na indústria de consumo.

O mercado internacional de óleos essenciais tem apresentado crescimento contínuo, sendo estimado em US\$ 10,3 bilhões em 2021, com projeções de alcançar US\$ 16 bilhões até 2026 (Bizzo e Rezende, 2022). Esses óleos são amplamente utilizados em diversos setores, com destaque para alimentos e bebidas (35%), fragrâncias, cosméticos e aromaterapia (29%), produtos domésticos (16%) e indústria farmacêutica (15%) (Padole et al., 2022). O Brasil tem se consolidado como um dos maiores exportadores globais, sendo, em 2020, o país com o maior volume de óleos essenciais exportados, com destaque para o óleo essencial de laranja, amplamente utilizado na indústria cosmética (Bizzo e Rezende, 2022).

O segmento cosmético, em particular, tem se destacado como um dos principais consumidores de óleos essenciais, impulsionado pela crescente demanda por ingredientes naturais e sustentáveis em produtos para cuidados com a pele, cabelos, perfumes e aromaterapia. Esse interesse se deve, em

grande parte, às propriedades biológicas desses compostos, que vão além do aroma característico e desempenham diversas funções, como antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana e anticancerígena (Tit e Bungau, 2023; Thitinarongwate et al., 2022; Hou et al., 2022; Lauricella et al., 2022). Essas propriedades têm sido amplamente exploradas no desenvolvimento de formulações cosméticas e farmacêuticas voltadas para a proteção contra danos oxidativos e processos inflamatórios desregulados (Borges et al., 2018; Araujo et al., 2021).

A composição química dos óleos essenciais pode variar significativamente em função do método de extração, da espécie vegetal e da parte da planta utilizada. Esses compostos são formados predominantemente por metabólitos secundários, como compostos fenólicos, terpenos e alcaloides, que desempenham papéis fundamentais nas propriedades biológicas dos óleos essenciais (Miranda et al., 2016; de Sousa et al., 2023). Entre esses constituintes, os terpenos são particularmente notáveis por sua diversidade estrutural e funcional. Com mais de 55.000 moléculas identificadas, esses metabólitos são responsáveis por efeitos antimicrobianos, analgésicos, neuroprotetores, antifúngicos, antiparasitários, antivirais, antialérgicos, antiespasmódicos, hipoglicêmicos, anti-inflamatórios e imunomoduladores, tornando-os alvos de investigações para aplicações na indústria cosmética e farmacêutica (Zore et al., 2011; Menezes et al., 2017).

Considerando a relevância dos mecanismos biológicos envolvidos, as atividades antioxidante e anti-inflamatória dos óleos essenciais têm sido amplamente investigadas, especialmente no contexto de formulações voltadas para a proteção contra danos oxidativos e inflamação desregulada (Borges et al., 2018; Araujo et al., 2021). Dessa forma, a compreensão desses efeitos é essencial para a aplicação segura e eficaz dos óleos essenciais em produtos cosméticos.

1.1.1. Atividade antioxidante

Pesquisas têm enfatizado a importância dos antioxidantes naturais, especialmente diante da crescente preocupação com os potenciais efeitos adversos dos antioxidantes sintéticos no organismo. Nesse contexto, os estudos têm se concentrado na identificação de compostos naturais com potente atividade antioxidante e baixa citotoxicidade (Gulcin, 2020).

Embora o organismo humano possua mecanismos endógenos de defesa antioxidante, a exposição contínua a fatores externos, como poluição, radiação ultravioleta e xenobióticos, pode resultar em um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A manutenção do equilíbrio entre a produção de EROs e a ação dos antioxidantes é essencial para prevenir danos celulares e preservar a homeostase celular. Quando esse equilíbrio é rompido, ocorre o estresse oxidativo, um processo associado a danos teciduais, morte celular e ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, cardiopatias e distúrbios neurodegenerativos (Huyut et al., 2017; Bhattacharjya et al., 2019).

Os antioxidantes atuam como moléculas capazes de inibir reações oxidativas em cadeia, neutralizando as espécies EROs que são prejudiciais à célula, especialmente sob condições de estresse oxidativo. O principal objetivo dos antioxidantes é se ligarem às EROs e impedir que danifiquem as células saudáveis, prevenindo mutações no DNA e danos nas membranas celulares e proteínas (Gupta, 2015).

No contexto dermatológico, o estresse oxidativo está diretamente relacionado ao envelhecimento cutâneo, pois a ação dos radicais livres acelera a degradação de colágeno, elastina e outras macromoléculas estruturais da pele. Esse processo leva à perda da elasticidade e firmeza, resultando no surgimento de rugas, flacidez e hiperpigmentação (Vinardell et al., 2023). Assim, a busca por ingredientes cosméticos com propriedades antioxidantes tem se intensificado, visando o desenvolvimento de formulações eficazes no combate ao envelhecimento precoce.

Diante disso, a avaliação da atividade antioxidante tornou-se um pilar fundamental na pesquisa e desenvolvimento de ingredientes cosméticos com o apelo ao antienvelhecimento. Métodos *in vitro*, como o ensaio de DPPH,

ABTS e a quantificação da produção de EROs, são amplamente utilizados para medir a capacidade de neutralizar radicais livres (Vinardell et al., 2023).

A complexidade química dos óleos essenciais faz com que sua atividade antioxidante não seja atribuída a um único composto, mas sim ao efeito sinérgico entre seus diversos constituintes. Estudos demonstram que compostos fenólicos, flavonoides e terpenos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos óleos essenciais. Esses metabólitos secundários podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores enzimáticos e quelantes de metais, contribuindo para a manutenção do equilíbrio oxidativo entre a produção e o combate às EROs (Castro et al., 2022; Shen et al., 2022).

1.1.2. Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta fisiológica essencial para a defesa do organismo contra patógenos, sendo desencadeada por lesões nos tecidos ou infecções. No entanto, quando desregulada, pode resultar em danos celulares, perda de função tecidual e aumento na produção das EROs, potencializando o estresse oxidativo (Lindley et al., 2016). Esse processo inflamatório é mediado por citocinas, que regulam a resposta imune e coordenam a progressão da inflamação. Essas moléculas podem atuar de forma pró-inflamatória, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , amplificando a inflamação, ou anti-inflamatória, como IL-10 e IL-4, que modulam e atenuam a resposta inflamatória (Nunes et al., 2018).

As citocinas também influenciam a atividade, diferenciação e proliferação das células imunológicas, incluindo macrófagos, neutrófilos e linfócitos (Koh e Dipietro, 2011). Entre elas, os macrófagos desempenham um papel crucial na regulação inflamatória, secretando mediadores como óxido nítrico (NO), prostaglandina E₂ (PGE₂) e citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β). A ativação dessas moléculas ocorre por vias intracelulares, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que controla a expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas (como TNF- α e IL-1), ciclooxigenase-2 (COX-2), e a ativação da iNOS (Arulselvan et al., 2016; Marques et al., 2019).

Esse equilíbrio inflamatório não apenas protege os tecidos, mas também influencia diretamente no processo de cicatrização. A resposta inflamatória está diretamente ligada à cicatrização, pois enquanto o corpo está em processo de

defesa, o reparo tecidual acontece de forma simultânea; por isso, o controle adequado da inflamação é essencial garantir uma regeneração tecidual eficiente. A cicatrização ocorre em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelamento. A fase inflamatória prepara o ambiente para a regeneração, enquanto a fase proliferativa estimula a formação do tecido de granulação e angiogênese, sob a regulação de fatores como PDGF e TGF- β , que promovem a produção de colágeno tipo I e a contração da ferida. Por fim, na fase de remodelamento, o colágeno tipo III inicial é substituído por colágeno tipo I, conferindo maior resistência ao tecido cicatricial (Lindley et al., 2016).

Estudos demonstram que compostos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias podem modular a expressão de citocinas e fatores de crescimento, acelerando a fase proliferativa e reduzindo a formação de cicatrizes hipertróficas (Kim et al., 2017). Os óleos essenciais são reconhecidos por sua atividade anti-inflamatória, atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos e terpenos, que regulam vias inflamatórias ao reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios e aumentar a liberação de citocinas anti-inflamatórias (Zhang e Tsao, 2016).

Marques et al. (2019) relataram a atividade anti-inflamatória *in vitro* de terpenos via supressão da geração de superóxido e óxido nítrico pela via de sinalização NF- κ B. Como resultado, os terpenos reduziram as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 α e aumentaram a produção de IL-10. De forma complementar, de Christo Scherer et al. (2019) demonstraram que os terpenos terpinoleno e α -felandreno aumentaram significativamente a migração e proliferação de fibroblastos, enquanto suprimiam IL-6 e TNF- α de forma dose-dependente, reforçando o potencial dos terpenos como agentes anti-inflamatórios.

Para investigar o potencial cicatrizante dos óleos essenciais e outros compostos terapêuticos, ensaios *in vitro*, como *Scratch assay* e BrdU, são amplamente utilizados para analisar a migração e proliferação celular. Esses testes permitem verificar sua capacidade de modular a inflamação e estimular a regeneração tecidual, fornecendo novos insights para o desenvolvimento de produtos terapêuticos voltados à cicatrização de feridas (Fronza et al., 2009).

1.1.3. *Ocimum gratissimum*

O Brasil, conhecido por ser o país com a maior biodiversidade do mundo, detém mais de 55.000 espécies vegetais conhecidas, distribuídas pelos seis biomas terrestres (Ministério do Meio Ambiente, 2020). Dentre essa vasta variedade, destaca-se a família botânica *Lamiaceae*, que é reconhecida por suas propriedades medicinais, e compreende 236 gêneros e 7.200 espécies, sendo que 46 gêneros e 524 espécies são nativos do Brasil (Soares et al., 2019).

Nesse contexto, o gênero vegetal *Ocimum* pertencente à família *Lamiaceae*, conhecidas popularmente como “alfavacas” e “manjericões”, têm sido um destaque no meio científico pelo uso de seus óleos essenciais (Vasconcelos et al., 2021). Entre as espécies, *Ocimum gratissimum* (Figura 1) se destaca por ser uma planta medicinal amplamente reconhecida por seu potencial terapêutico, empregada na medicina tradicional para tratar várias enfermidades, incluindo tosse, pneumonia, febre, inflamação, anemia, diarreia, dores e infecções causadas por fungos e bactérias, além de seu uso como condimento natural e aromatizante em comidas (Chimnoi et al. (2018).

Trata-se de uma espécie herbácea perene, de grande interesse comercial, destacando-se pelo seu aroma intenso e propriedades bioativas. Possui entre 1 e 3 cm de altura, seu caule é ereto, ramificado e de formato quadrangular, tornando-se lenhoso na base, enquanto suas folhas são opostas, delgadas e apresentam margens bem definidas (Chimnoi et al. (2018). A espécie possui ampla distribuição na África, Ásia e América do Sul (Tanko et al., 2008; Soares et al., 2019; Akara et al., 2021).



Fonte: Mbuvi et al. (2019).

Figura 1. Folhas de *Ocimum gratissimum*.

O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) apresenta uma composição rica em compostos bioativos, incluindo eugenol, timol, linalol, germacreno D e β -ocimeno, responsáveis por suas propriedades farmacológicas. Pesquisas fitoquímicas indicam que os compostos fenólicos são os principais constituintes desta espécie, sendo os componentes majoritários o eugenol, o timol e o geraniol (Vilanova, 2018; Souza et al., 2015).

Além desses compostos, também são relatados na composição química da espécie: estragol, metileugenol, γ -terpineno, β -cimeno, pipeno, linalol, limoneno, cariofileno, terpinen-4-ol, α -terpeno, mirceno, α -tujeno, carvacrol, 1,8-cineol, β -selineno, β -elemeno, cis-ocimeno, germacreno D e β -pineno, entre outros (Mohr et al., 2017; de Oliveira et al., 2021). Na literatura, são reconhecidos três quimiotipos de *O. gratissimum*, classificados de acordo com o constituinte predominante em seu óleo essencial: eugenol, geraniol e timol (Vianna, 2009).

Sua composição química pode variar conforme fatores ambientais e genéticos, influenciando sua atividade farmacológica e perfil toxicológico. Entre esses fatores, destacam-se altitude, temperatura, umidade, tipo de solo e estágio de desenvolvimento da planta, os quais podem influenciar

significativamente a concentração e o perfil dos compostos bioativos presentes no óleo essencial (Mohr et al., 2017; Chimnoi et al., 2018).

Diversos estudos descrevem os possíveis efeitos biológicos do OG, destacando sua ampla gama de atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana, antifúngica, antinociceptiva, antiprotzoária, antioxidante e anti-inflamatória. Essas propriedades são atribuídas à presença de terpenos e compostos fenólicos, que atuam por diferentes mecanismos, como desestabilização de membranas microbianas, modulação da resposta inflamatória e neutralização de radicais livres. Essas características tornam o OG um potencial candidato para aplicações farmacêuticas e cosméticas, especialmente em formulações voltadas para o tratamento de infecções, inflamações e distúrbios oxidativos (Joshi, 2013; Okoye et al., 2014; Mohr et al., 2017; Ugbogu et al., 2021).

Apesar de seu amplo potencial terapêutico, a aplicação do OG apresenta desafios, por sua alta volatilidade e instabilidade devido a fatores ambientais, como as mudanças de temperatura, exposição a radiação UV e aos processos oxidativos. Essas condições podem comprometer sua atividade biológica ao degradar seus compostos químicos. Para superar essas limitações, a nanotecnologia tem sido amplamente explorada, com destaque para sistemas de encapsulação, como nanoemulsões, nanopartículas e lipossomas, que protegem os compostos ativos, aumentam sua estabilidade e permitem uma liberação controlada, aumentando sua eficácia terapêutica (El Asbahani et al., 2015).

1.2. Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma abordagem multidisciplinar que envolve o desenvolvimento, estudo e aplicação de materiais e sistemas em escala nanométrica. O termo “nano” refere-se a estruturas com dimensões na ordem de nanômetros, ou seja, um bilionésimo de metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) (Raj et al., 2012).

O conceito de nanotecnologia surgiu em 1959 com o discurso “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, proferido pelo físico Richard Feynman durante um encontro da Sociedade Americana de Física, no qual ele destacou a possibilidade de manipular materiais na escala atômica. Posteriormente, em

1974, o termo foi oficializado pelo pesquisador Norio Taniguchi, da Universidade de Tóquio, que definiu a nanotecnologia como “a habilidade de criar materiais com precisão em escala nanométrica” (Cadioli e Salla, 2006; Hulla et al., 2015).

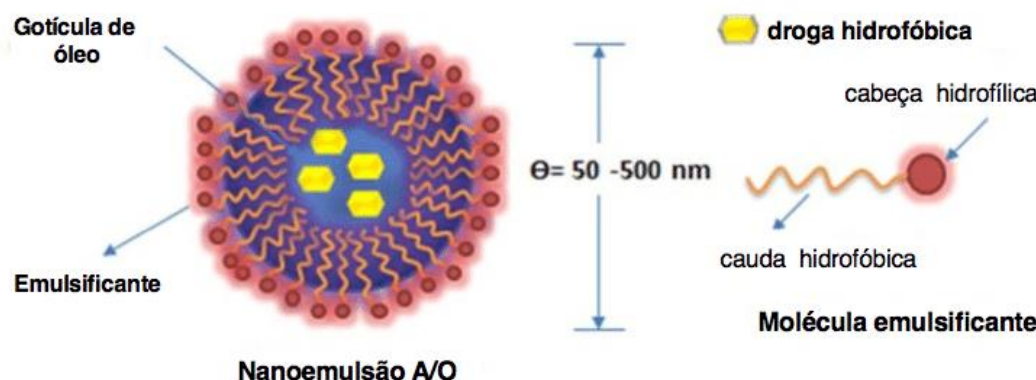
Os nanomateriais apresentam propriedades físico-químicas aprimoradas devido ao seu tamanho reduzido e aumento da área de superfície, o que influencia características como temperatura de fusão, estabilidade e solubilidade. Em comparação com partículas de maior tamanho, as nanopartículas oferecem maior biodisponibilidade, facilitando a absorção e penetração em membranas biológicas, incluindo a pele e tecidos celulares (Mihrianyan et al., 2012; Gupta et al., 2022).

Dessa forma, a nanotecnologia tem sido amplamente explorada em diversas áreas, incluindo química, física, biologia, agricultura, engenharia, medicina, tecnologia da informação, neurociência cognitiva e biotecnologia. No setor farmacêutico e cosmético, a nanotecnologia permite otimizar a entrega de compostos bioativos, tornando-os mais eficazes e seguros para aplicações terapêuticas (Antunes e Backx, 2020).

1.2.1. Nanoemulsões

A nanoencapsulação tem se destacado como uma estratégia eficaz para a veiculação e proteção de compostos bioativos, especialmente os compostos lipofílicos, como os óleos essenciais. Essa abordagem melhora a estabilidade química, reduz a volatilização e protege os ativos de processos de degradação oxidativa e térmica, garantindo maior eficácia terapêutica (Blanco-Padilla et al., 2014; Singh e Pulikkal, 2022).

Dentre as diferentes abordagens da nanotecnologia, as nanoemulsões se destacam por sua versatilidade e eficiência na entrega de compostos bioativos. Elas são definidas como sistemas coloidais compostos por dois líquidos imiscíveis, onde pequenas gotículas da fase dispersa (óleo) se distribuem em um meio contínuo (geralmente aquoso), sendo estabilizadas por tensoativos. Quando a fase dispersa é composta por óleo e a fase contínua por água, obtém-se uma nanoemulsão do tipo óleo em água (O/A), enquanto o inverso resulta em uma nanoemulsão água em óleo (A/O) (Figura 2) (Echeverría e Albuquerque, 2019; Ashaolu, 2021).



Fonte: Adaptado de Sanghi e Singh (2012).

Figura 2. Representação esquemática de gotícula de nanoemulsão O/A.

As nanoemulsões possuem gotículas com diâmetros entre 10 e 500 nm, o que resulta em um aumento da área de superfície e melhor dispersão dos compostos ativos. Essa característica influencia diretamente a solubilidade, absorção e estabilidade dos ativos, permitindo uma liberação controlada e potencializando seus efeitos terapêuticos (Mushtaq et al., 2023). A aparência óptica das nanoemulsões varia de translúcida a leitosa, dependendo do tamanho das gotículas e do comprimento de onda da luz incidente, sendo translúcidas abaixo de 200 nm e apresentando aparência opaca quando as gotículas ultrapassam 500 nm (Sundararajan et al., 2018).

Para caracterizar as nanoemulsões, o espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica amplamente utilizada que permite a determinação do tamanho médio das gotículas, sua distribuição de tamanho e o índice de polidispersidade (PDI). O método baseia-se na análise das flutuações da luz espalhada quando um feixe de laser incide sobre as partículas dispersas no meio. Essas flutuações ocorrem devido ao movimento browniano das gotículas, e a velocidade desse movimento está relacionada ao seu tamanho. Dessa forma, o DLS fornece informações essenciais sobre a estabilidade física da nanoemulsão, uma vez que variações no tamanho das partículas ao longo do tempo podem indicar processos como agregação ou coalescência, impactando

diretamente a funcionalidade e a eficácia da formulação (Grapentin et al., 2015).

A aplicação das nanoemulsões na indústria cosmética e farmacêutica tem sido amplamente estudada devido aos benefícios na absorção cutânea e estabilidade dos compostos ativos. Comparadas às emulsões convencionais, as nanoemulsões demonstram maior eficácia na penetração cutânea, permitindo melhor biodisponibilidade dos ativos e aumentando seus efeitos biológicos (Nohynek et al., 2008). Além disso, apresentam vantagens como baixo custo de produção, controle na liberação dos ativos, melhora da eficácia farmacológica e aumento da estabilidade termodinâmica. As nanoemulsões formadas por óleos essenciais podem, portanto, exibir desempenho superior, melhorando a solubilidade em água, a estabilidade e a atividade biológica (Echeverría e Albuquerque, 2019).

O uso de nanoemulsões contendo óleos essenciais do gênero *Ocimum* vem sendo explorada devido à sua capacidade de potencializar propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante e larvicida. Estudos como o de Sundararajan et al. (2018) demonstraram que a nanoemulsão contendo óleo essencial de *Ocimum basilicum* exibiu atividade antimicrobiana e antioxidante superiores ao óleo essencial puro, enquanto Soundararajan et al. (2021) observaram maior eficácia antioxidante e larvicida na nanoemulsão de *Ocimum tenuiflorum*, especialmente na neutralização do radical DPPH.

Pesquisas recentes também têm explorado as propriedades e aplicações de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. Araujo et al. (2021) desenvolveram nanoemulsões utilizando goma de cajueiro como co-surfactante e OG, demonstrando ótima estabilidade e potencial ação antimicrobiana e antioxidante. Onwuzuligbo (2024) investigaram a eficácia da nanoemulsão no tratamento da malária, enquanto Ontao et al. (2021) avaliaram sua estabilidade físico-química, observando que as nanoemulsões apresentaram baixo índice de polidispersidade e excelente estabilidade térmica.

No entanto, não há relatos específicos sobre a atividade anti-inflamatória da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG), assim como as investigações voltadas para a avaliação de sua segurança, fator essencial para garantir sua aplicação terapêutica e cosmética. Dessa forma, surge a necessidade de

pesquisas adicionais que aprofundem tanto os mecanismos de ação quanto os parâmetros de segurança, permitindo o uso mais eficaz e seguro desses sistemas nanoestruturados.

1.3. Avaliação da segurança de ingredientes cosméticos

A avaliação da segurança de uma formulação cosmética é essencial para garantir a proteção da saúde do consumidor. A combinação dos ingredientes e os métodos de fabricação podem impactar diretamente a estabilidade, a toxicidade e a eficácia do produto final (Brasil, 2012).

Até o século passado, a toxicidade dessas formulações era avaliada quase exclusivamente por meio de testes em modelos animais (Basketter et al., 2013). O Teste de Draize, desenvolvido por John H. Draize em 1944, foi o primeiro método preliminar para avaliar a irritação ocular causada por medicamentos, cosméticos e produtos químicos. No entanto, ao longo dos anos, o teste sofreu várias modificações para reduzir o número de animais utilizados e minimizar o sofrimento gerado. Com isso, diversos pesquisadores deram início a criação de métodos alternativos para determinar a irritação ocular (Bradlaw, 1997).

Em 1959, o zoólogo William Russell e o microbiologista Rex Burch introduziram um novo paradigma na experimentação animal em seu livro "*Principles of Human Experimental Technique*". Os autores propuseram que a boa prática científica com animais deveria obedecer aos princípios dos "3Rs": substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*), ou seja, que pudessem substituir, refinar e/ou reduzir a utilização de animais para avaliação da segurança de produtos. A partir dessa conceituação, reconheceu-se a necessidade de desenvolver modelos alternativos validados, impulsionando os estudos nessa área (Ranganatha e Kuppast, 2012).

No mesmo ano, foi criada a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), uma organização internacional composta por 34 países, dedicada ao desenvolvimento, implementação e validação de diretrizes e protocolos padronizados para testes toxicológicos e de segurança que não envolvem o uso de animais (Kirk, 2018).

Enquanto a OECD valida e padroniza esses métodos internacionalmente, no Brasil, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) é responsável por estabelecer diretrizes para o uso ético de animais em ensino e pesquisa científica e supervisionar a adoção e avaliação de métodos alternativos destinados a substituir, reduzir ou aprimorar o uso de animais (Brasil, 2008). Em 2023, o CONCEA publicou a Resolução Normativa nº 58, que proíbe o uso de animais vertebrados em pesquisas relacionadas a produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes cujos ingredientes já têm segurança e eficácia comprovadas cientificamente.

1.3.1. Métodos alternativos para avaliação da segurança de ingredientes cosméticos

Atualmente, diversos métodos alternativos validados são descritos em protocolos disponíveis nos guias da OECD. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou o "Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos" com o objetivo de sugerir critérios e fornecer subsídios para a avaliação de segurança de produtos cosméticos, além de orientar pesquisadores e empresas sobre os métodos apropriados para essa avaliação (Brasil, 2012).

Atualmente, o CONCEA reconhece 25 métodos alternativos ao uso de animais, dos quais 17 estão especificados na Resolução Normativa (RN) nº 18 (CONCEA, 2014b). Esses métodos são destinados a avaliações como potencial de irritação e corrosão da pele, irritação e corrosão ocular, fototoxicidade, absorção cutânea, sensibilização cutânea, toxicidade aguda e genotoxicidade, conforme detalhado no Quadro 1.

Quadro 1. Métodos alternativos reconhecidos pela Resolução Normativa nº 18 do CONCEA e seus respectivos desfechos.

DESFECHO	MÉTODO ALTERNATIVO
Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele	Método OECD TG 430 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de Resistência Elétrica Transcutânea
	Método OECD TG 431 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da Epiderme Humana Reconstituída
	Método OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i>
	Método OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea <i>in vitro</i>
Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular	Método OECD TG 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina
	Método OECD TG 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha
	Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína
Avaliação do potencial de fototoxicidade	Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU
Avaliação da absorção cutânea	Método OECD TG 428 - Absorção Cutânea método <i>in vitro</i>
Avaliação do potencial de sensibilização cutânea	Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local
	Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local
Avaliação de toxicidade aguda	Método OECD TG 420 - Toxicidade Aguda Oral - Procedimento de Doses Fixas
	Método OECD TG 423 - Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda
	Método OECD TG 425 - Toxicidade Aguda Oral - procedimento "Up and Down"
	Método OECD TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica
Avaliação de genotoxicidade	Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i>

Com o objetivo de enriquecer essas análises, existem outros métodos que, embora não validados pela OECD, são amplamente utilizados como

ferramentas de triagem preliminar para identificar possíveis efeitos adversos de substâncias. Entre esses, destacam-se a avaliação do potencial de irritação ocular pelo teste de fotohemólise em glóbulos vermelhos (Photo-RBC), o teste na membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM) e sua variação, o CAM-TBS (Oliveira et al., 2012).

1.4. Hipótese

A hipótese deste trabalho é que a nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* possui maior estabilidade e eficácia biológica em comparação ao óleo essencial isolado, destacando-se por suas propriedades antioxidantes, cicatrizantes e anti-inflamatórias, sem causar toxicidade ou fototoxicidade significativa, configurando-se como uma formulação promissora para aplicações cosméticas e terapêuticas tópicas.

OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e caracterizar a nanoemulsão do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, avaliando sua estabilidade, segurança e eficácia biológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*;
- Formular a nanoemulsão contendo óleo essencial de *Ocimum gratissimum*;
- Caracterizar e avaliar a estabilidade da nanoemulsão;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial e da nanoemulsão;
- Investigar os efeitos anti-inflamatórios *in vitro* do óleo essencial e da nanoemulsão;
- Determinar os efeitos *in vitro* do óleo essencial e da nanoemulsão sobre a proliferação e migração de fibroblastos;
- Avaliar a segurança da nanoemulsão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Polissorbato 80 (Tween 80®) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Cloreto de sódio (NaCl), tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4), lauril sulfato de sódio (SDS, 1%) e hidróxido de sódio (NaOH, 0,1 N) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), corante vermelho neutro (NRU), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O OG foi fornecido por um fornecedor comercial HAJE®, certificado e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (4°C). O meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (200 mM) e a solução de penicilina-estreptomicina (10.000 U/mL penicilina e 10 mg/mL estreptomicina) foram obtidos da Gibco BRL (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As linhagens celulares utilizadas incluem fibroblastos 3T3 (ATCC CCL-92), adquiridos da Eucellbank (Universidade de Barcelona, Espanha), e fibroblastos L929 (ATCC CRL-6364), macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) e queratinócitos HaCaT, adquiridos pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

2.2. Caracterização química do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Para caracterização química do OG foram realizadas análises por um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas da Agilent (7890 B) e detector de massa modelo 5977A MSD com impacto de elétrons de 70eV. Foi utilizada uma coluna HP-5 de 30 m x 250 µm x 0,25 µm para realizar o processo de separação. O injetor foi ajustado para uma temperatura de 290°C e o detector para 310°C. O sistema de eluição foi feita em uma rampa de aquecimento iniciando a 40°C com taxa de aquecimento de 5°C/min até 280°C, seguido com taxa de aquecimento de 15°C/min até 310°C. Para caracterização dos compostos químicos, foi utilizado padrão de alcano de C10 a C40 para a cálculo do índice de Kovats (IK). A identificação das substâncias foi através da

comparação dos espectros de massas da biblioteca NIST com os índices de retenção e semelhança dos espectros de massas com dados da literatura (Adams, 2017).

2.3. Preparação das nanoemulsões

A NG foi formulada utilizando o método de baixa energia por formação espontânea, descrito por Singh e Pulikkal (2022). Esse método consiste na formação espontânea da nanogotícula quando a fase oleosa (óleo essencial) e a fase aquosa são misturadas sob constante agitação. A adição do tensoativo estabiliza o sistema, o que permite a dispersão da gotícula formada em meio aquoso.

Para o início dos testes de estabilidade, foi adicionado 5% de OG, enquanto os 95% restantes consistiam em água e emulsificantes. A composição final foi seguida pela equação 1:

$$5\% \text{ Óleo de } \textit{Ocimum gratissimum} + x\% \text{ Emulsificantes} + (95\% - x\%) \text{ Água} = 100\% \text{ Solução (Equação 1)}$$

Para o preparo das nanoemulsões, foram empregados os emulsificantes polissorbato 20 (Tween 20 - EHL 16,7), polissorbato 80 (Tween 80 - EHL 15), trioleato de sorbitano (Span 85 - EHL 1,8) e monooleato de sorbitano (Span 80 - EHL 4,3), ajustados a valores de Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) de 15, 13, 11 e 10. As concentrações de emulsificantes variaram entre 5%, 10%, 15% e 20%. O cálculo das quantidades de cada emulsificante (m_a e m_b) baseou-se no valor final de EHL desejado (EHL_f), a proporção total de emulsificantes ($m_t = m_a + m_b$) e os EHLs individuais dos componentes (EHL_a e EHL_b), utilizando a equação 2:

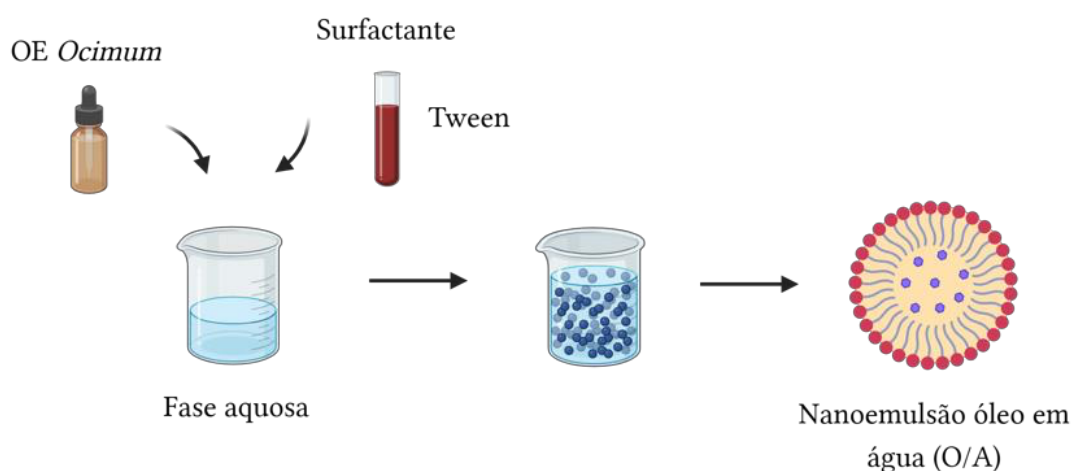
$$EHL_f = \frac{[(EHL_a \times m_a) + (EHL_b \times m_b)]}{(m_a + m_b)} \quad \text{(Equação 2)}$$

Após determinar as massas necessárias, a fase oleosa foi preparada pela mistura dos emulsificantes e do óleo essencial (Figura 3). A fase aquosa foi adicionada sob agitação contínua em vórtex para produzir o sistema

nanoencapsulado. As formulações mais estáveis foram diluídas em proporção de 1:10 (v/v) para volumes de 1 mL, 2 mL, 3 mL e 4 mL.

Após as diluições em água, as nanoemulsões foram avaliadas visualmente quanto à estabilidade, verificando a presença de separação de fases e a observação do efeito *Tyndall* sob luz, devendo ser observado a coloração azulada na solução. O efeito *Tyndall* ocorre pelo espalhamento da luz nas gotículas dispersas, indicando boa estabilidade quando o feixe de laser permanece visível e uniforme, sem turvação ao longo do tempo (Kim et al., 2018).

As formulações mais estáveis foram submetidas a testes adicionais de estabilidade sob temperaturas controladas (8°C e 40°C) e centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos. As amostras aprovadas passaram por análises de pH, índice de refração e transmitância a 600 nm para confirmar suas propriedades físico-químicas (Fernandes et al., 2014; Ortiz-Zamora et al., 2020; Lima et al., 2021).



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 3. Fluxograma da formulação da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum*.

2.4. Caracterização das nanoemulsões

2.4.1. Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta

O tamanho da partícula (nm), índice de polidispersividade (PDI) e o potencial Zeta (mV) da NG foram determinados no dia 1 (D1), dia 7 (D7), dia 15 (D15), dia 30 (D30) e dia 60 (D60) por espalhamento dinâmico de luz (DLS), com laser em 658 nm e ângulos de espalhamento de 15°, 90°, 175°, usando Litesizer 500 (Anton Paar, Graz, Áustria) (Stetefeld et al., 2016). Os parâmetros foram estimados pela média de três medições.

2.4.2. Estabilidade em diferentes temperaturas de armazenamento

A estabilidade térmica da triplicata das NGs foi avaliada quanto ao tamanho da partícula (nm), índice de polidispersividade (%) e potencial Zeta (mV) por DLS nos dias D1, D7, D15, D30 e D60. As nanoemulsões foram aliqüotadas em triplicata e armazenadas em três diferentes condições: a 4 ± 2 °C, a 25 ± 2 °C e a 37 ± 2 °C (Brasil, 2004).

2.5. Determinação da atividade antioxidante química

2.5.1. Ensaio de ABTS

A atividade antioxidante do OG e da NG foi avaliada utilizando o método ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), descrito por Lorençoni et al. (2020). Este ensaio determina a capacidade da amostra de capturar radicais livres do tipo ABTS⁺. A solução estoque de ABTS foi preparada com concentração de 7 mM, e radicais livres foram gerados usando K₂S₂O₈ a 2,45 mM. As amostras do OG e NG foram diluídas em etanol 70% em diferentes concentrações (0,1 a 100 µg/mL). 30 µL de cada amostra teste foi transferida para microplacas onde adicionou-se 270 µL da solução de ABTS. Após incubação, a absorbância foi medida a 734 nm. Os resultados foram expressos em IC₅₀, representando a concentração necessária para reduzir 50% dos radicais livres. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5.2. Ensaio de DPPH

A atividade antioxidante do OG e NG também foi avaliada utilizando o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), conforme Lorençoni et al. (2020). A solução de DPPH foi preparada na concentração de aproximadamente 40 µg/mL, garantindo uma absorbância inicial entre 0,9 e 1,1 a 517 nm. As amostras foram preparadas nas concentrações de 0,1 a 100 µg/mL em etanol 70% e, posteriormente, diluídas para os testes em microplaca. No ensaio, 30 µL das amostras foram adicionados a cada poço da microplaca, seguidos de 270 µL da solução de DPPH. As placas foram mantidas em repouso no escuro por 60 minutos antes da leitura da absorbância a 517 nm. Os resultados foram expressos em IC₅₀, representando a concentração necessária para reduzir 50% dos radicais livres. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6. Cultivo das linhagens celulares

As linhagens celulares de fibroblastos L929 (ATCC CRL-6364™), fibroblastos 3T3, macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71™) e HaCaT foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) adequado para cada tipo celular, suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (quando necessário) e penicilina-estreptomicina em diferentes concentrações. As células foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 97% de umidade relativa, até atingirem 80% de confluência. A linhagem 3T3 foi adquirida do Eucellbank (Universitat de Barcelona, Espanha), enquanto as demais foram obtidas de coleções reconhecidas, como ATCC.

2.7. Ensaio de viabilidade celular

2.7.1. Avaliação de citotoxicidade *in vitro* (MTT)

Para análise da citotoxicidade, foi utilizado o método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), conforme descrito por Mosmann (1983). Fibroblastos L929, macrófagos RAW 264.7 e queratinócitos HaCaT (7×10^4 células/mL) foram cultivados em placas de 96 poços e mantidos a 5% de CO₂ a 37 °C durante a noite. Em seguida, foram expostos a diferentes concentrações de OG e NG (20, 10, 5, 2,5 1,25 µg/mL) por 24 horas. Após o período de exposição, 100 µL de MTT (1 mg/mL) foi adicionado a cada poço e incubado por mais 3 horas. Em seguida, o excesso

de MTT foi aspirado, e os cristais de formazana formados foram dissolvidos em 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância proporcional ao número de células viáveis, foi medida a 595 nm, utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max 190, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7.2. Citotoxicidade pelo método de vermelho neutro (NRU)

O efeito citotóxico do OG e NG também foi avaliado pelo ensaio de captação de vermelho neutro (NRU) (Borenfreund e Puerner, 1985). Fibroblastos 3T3 foram cultivados nos 60 poços centrais de uma placa de 96 poços com densidades de 1×10^5 células/mL. Após incubação por 24 horas em atmosfera com 5% de CO₂ a 37 °C, o meio consumido foi substituído por 100 µL de meio fresco suplementado com 5% de SFB contendo a OG e NG nas concentrações de 10 e 1 µg/mL. Após 24 horas, o meio foi aspirado e 100 µL de solução NR a 50 µg/mL em DMEM sem SFB e vermelho de fenol foram adicionados a cada poço para o ensaio NRU. As placas foram incubadas por mais 3 horas, após as quais o meio foi removido e as células foram lavadas uma vez com PBS. Em seguida, 100 µL de uma solução contendo 50% de etanol absoluto e 1% de ácido acético em água destilada foram adicionados para extrair o corante. Após 5 minutos em agitador de microplacas à temperatura ambiente, a absorbância das soluções resultantes foi medida a 550 nm usando um leitor de microplacas Bio-Rad 550. O efeito de cada tratamento foi calculado como a porcentagem de inibição da viabilidade celular em comparação com os respectivos controles.

2.8. Determinação da atividade antioxidante intracelular *in vitro*

2.8.1. Efeito preventivo contra o dano oxidativo *in vitro* por H₂O₂

O efeito protetor do OG e NG contra os danos oxidativos causado por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em macrófagos RAW 264.7 foi conduzido de acordo com a metodologia adaptada por Kwon et al. (2019). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 7×10^4 células/mL. Após 24 horas, as células foram expostas a diferentes concentrações de OG e NG e 500 µM de H₂O₂ foram adicionados. Após 24 horas de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico MTT método. A

enzima catalase (CAT) foi usado como controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como média $\pm$ DP da viabilidade celular (%).

2.8.2. Determinação indireta *in vitro* de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi avaliada de forma indireta em uma cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, conforme Soares et al. (2021). Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços a uma concentração de 8×10^4 células/mL por 24 horas, mantidos em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, as amostras foram expostas a diferentes concentrações de OG e NG e estimuladas com 1 µg/mL de LPS. Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado para a quantificação de nitrito utilizando o reagente de Griess, conforme descrito por Green et al. (1982). A metodologia foi repetida em pelo menos dois dias diferentes, com triplicatas em cada experimento. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas a 540 nm, e os resultados foram expressos como valor médio de nitrito em µM.

2.8.3. Redução da produção do ânion superóxido

A metodologia foi baseada no estudo de Soares et al. (2021). Macrófagos RAW 264.7, a uma concentração de 8×10^4 células/mL, foram cultivados em placas de 96 poços e estimulados com LPS, além de serem expostos a diferentes concentrações de OG e NG. Após um período de 24 horas, a produção do radical ânion superóxido (O₂•⁻) foi avaliada. Para o controle positivo, foi utilizada a concentração de 10 µM de L-Name. O sobrenadante foi removido e as células foram expostas ao NBT (1 mg/mL) por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas com metanol e os cristais de formazana formados foram dissolvidos em uma solução de KOH (2M) e DMSO. A leitura foi realizada a um comprimento de onda de 630 nm, e a porcentagem de produção de O₂•⁻ foi calculada após pelo menos dois testes em triplicata realizados em dias distintos.

2.9. Determinação da atividade anti-inflamatória *in vitro*

2.9.1. Determinação *in vitro* de citocinas

A quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 em culturas de macrófagos RAW 264.7 estimulados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e expostos a 2,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de OG e NG foi realizada por meio do teste imunoenzimático (ELISA). O processo utilizou anticorpos e padrões específicos para cada citocina, conforme as instruções dos fabricantes Invitrogen® e eBioscience®. A leitura dos resultados foi feita em um leitor de microplacas, com um comprimento de onda de 450 nm. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, e os resultados obtidos expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

2.10. Atividade proliferativa celular (BrdU)

Para avaliar o efeito sobre a proliferação de fibroblastos, as células foram mantidas em cultura com meio Dubelcco modified Eagle medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C, 5% de CO₂. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 7×10^4 células/mL, com 90 μL de meio sem SFB. Após 24 horas, os efeitos de OG e NG na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ na proliferação de fibroblastos foram medidos com o análogo de timidina BrdU (5- bromo-2'-desoxiuridina), após sua incorporação no DNA recém-sintetizado e sua detecção com um anticorpo anti-BrdU de acordo com as instruções e especificações do fabricante (Roche® Mannheim, Alemanha).

2.11. Migração celular (*Scratch assay*)

A análise da proliferação e migração de fibroblastos foi realizada utilizando o *Scratch assay* como modelo experimental (Fronza et al., 2009). As células foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem uma monocamada confluyente. Uma ferida linear artificial (*scratch*) foi induzida na monocamada, utilizando uma ponteira estéril de 100 μL . As placas foram lavadas com solução salina estéril (PBS) para remoção das células durante a realização da ferida. Posteriormente, as monocamadas foram tratadas por 16 horas com 20 $\mu\text{g/mL}$ da NG e OG. As imagens das áreas foram feitas com uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio.

2.12. Ensaio da inibição da tirosinase

Para avaliar o efeito clareador do OG, foi utilizado o método modificado de inibição da tirosinase, conforme descrito previamente (Shimizu et al., 1998). Uma solução de tirosina (120 µL de 1,66 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) foi adicionada a 60 µL do óleo essencial, obtendo as concentrações finais de 10, 1 e 0,1 µg/mL, e 60 µL de tampão fosfato, em uma placa de 96 poços. A mistura foi incubada a 37°C ± 2°C por 20 minutos. Em seguida, 60 µL da solução de enzima tirosinase (150 mM em tampão fosfato) foi adicionado. A atividade enzimática foi medida a 37°C ± 2°C em leitor de microplacas, a 450 nm. Como controles positivos, foi utilizado o ácido kójico (AK) a 125 µg/mL. O experimento foi realizado em triplicata e expresso em porcentagem de inibição.

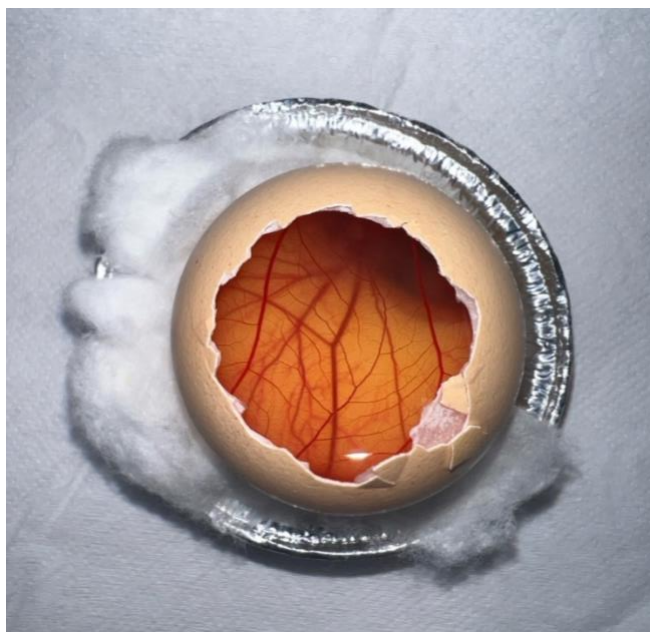
Devido às características do método empregado e à ausência de resposta na reação, a avaliação da inibição da tirosinase foi realizada exclusivamente com o óleo essencial, não sendo possível testar a nanoemulsão sob essas condições experimentais.

2.13. Métodos alternativos de segurança *in vitro* ao uso de animais

2.13.1. Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio HET-CAM

O potencial de irritação da NG desenvolvida foi avaliado utilizando o ensaio em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados, no inglês, *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane* (HET-CAM). Foram obtidos ovos de galinha da raça White Leghorn (Oliveira et al., 2012) do Incubatório Pérola, localizado no Estado do Espírito Santo.

Os ovos foram inspecionados visualmente para verificar a presença de rachaduras e, em seguida, incubados por 10 dias a partir do dia da postura, em uma chocadeira sob temperatura controlada de 37,5 °C e umidade relativa de 62,5%. No décimo dia de incubação, a casca do ovo foi cuidadosamente removida ao redor da câmara de ar para expor a membrana da casca (Figura 4). Após essa etapa, a membrana foi hidratada com uma solução salina por 1 minuto para facilitar a sua remoção cuidadosa, expondo assim a membrana cório-alantóide (CAM) e evitando danos a ela (Keifer e Effenberger, 1992; Oliveira et al., 2012).



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 4. Membrana cório-alantoide do ovo exposta previamente ao início do ensaio.

Após uma observação preliminar das características da membrana cório-alantóide (CAM), foram aplicados 300 μ L de nanoemulsão sobre a superfície da membrana. Após 20 segundos de contato, o produto foi removido por meio de uma lavagem com 5 mL de solução de NaCl 0,9% a 37°C. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras do grupo controle, utilizando uma solução salina (NaCl 0,9% p/v) como controle negativo e uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1N) como controle positivo. Após a remoção das amostras, a membrana cório-alantóide foi examinada visualmente por 5 minutos a partir da aplicação do produto, avaliando a ocorrência de sinais de reações irritativas, como hemorragia e coagulação (Keifer e Effenberger, 1992; Oliveira et al., 2012).

Por fim, com base no tempo e no tipo de fenômenos observados, uma pontuação é atribuída a cada formulação, conforme detalhado na Tabela 1 (39); (40).

Tabela 1. Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 min.

Fenômenos	Tempo		
	< 30s	30s < t ≤ 2 min	2min < t ≤ 5min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação/Opacidade	9	7	5

Fonte: Oliveira et al., 2012.

O cálculo do índice de irritabilidade, no inglês *irritation score* (IS) foi realizado utilizando a Equação 3:

$$IS = \frac{(301-HE) \times 5}{300} + \frac{(301-HP) \times 7}{300} + \frac{(301-CO) \times 9}{300} \quad (\text{Equação 4})$$

em que: IS = *irritation score*; HE = tempo de ocorrência de hemorragia (s); HP = tempo de ocorrência para hiperemia (s); e CO = tempo para ocorrência de coagulação. A classificação do grau de irritação quanto ao produto teste segue abaixo com a Tabela 2:

Tabela 2. Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM.

Classificação final dos produtos no HET-CAM	
Faixa (graduação das lesões)	Classificação
0,0 a 0,9	Não Irritante
1,0 a 4,9	Irritante Leve
5,0 a 8,9	Irritante Moderado
9,0 a 21	Irritante Severo

Fonte: ICCVAM, 2006d.

2.13.2. Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio CAM-TBS

A metodologia do teste segue etapas semelhantes ao HET-CAM, porém com a adição do corante azul de tripano para indicar lesões na membrana cório-alantóide (CAM). Após 10 dias de incubação, os ovos foram posicionados

verticalmente e um pequeno orifício foi feito na casca para expor a membrana cório-alantóide, que foi cuidadosamente preparada e delimitada com um anel de silicone (Yang et al., 2010; Oliveira et al., 2012). As amostras foram aplicadas na membrana em 0,3 mL, previamente solubilizadas em 1 mL de solução salina 0,9%. Após 20 segundos de contato, a membrana foi lavada e recebeu a aplicação de azul de tripano a 0,1% em PBS. O excesso de corante foi removido com água purificada, e a área delimitada foi excisada, transferida para um tubo Falcon contendo 5 mL de formamida e submetida à agitação e centrifugação para extração do corante (Lagarto et al., 2006). A absorbância do sobrenadante foi mensurada por espectrofotometria no comprimento de onda de 610nm, em tubos de ensaio contendo 5 mL de formamida. A quantidade de azul de tripano adsorvido na membrana cório-alantóide foi calculada com a seguinte equação 5, e a classificação do grau de irritação segue a Tabela 3.

$$\text{Corante absorvido} = \frac{\text{Abs} \times 5\text{nmol}}{1000 \times 10^9} \quad (\text{Equação 5})$$

Tabela 3. Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio CAM-TBS.

Classificação Final dos Produtos no CAM-TBS	
Faixa (quantidade de corante)	Classificação
< 7,0	Não Irritante/Irritante Leve
7,0 – 14,5	Moderadamente Irritante
> 14,5	Severamente Irritante

Fonte: Lagarto et al., 2006.

2.13.3. Teste de fotohemólise em glóbulos vermelhos (Photo-RBC)

O teste de fototoxicidade de glóbulos vermelhos (teste Photo-RBC) foi proposto por Pape et al. (2001) e avalia a hemólise e oxidação da hemoglobina em eritrócitos humanos. Este teste foi desenvolvido para identificar fotossensibilizadores e estudar os potenciais fototóxicos de produtos químicos com base em sua capacidade de hemolisar membranas de eritrócitos e/ou oxidar a hemoglobina sob exposição à luz solar simulada (UVA e UVB).

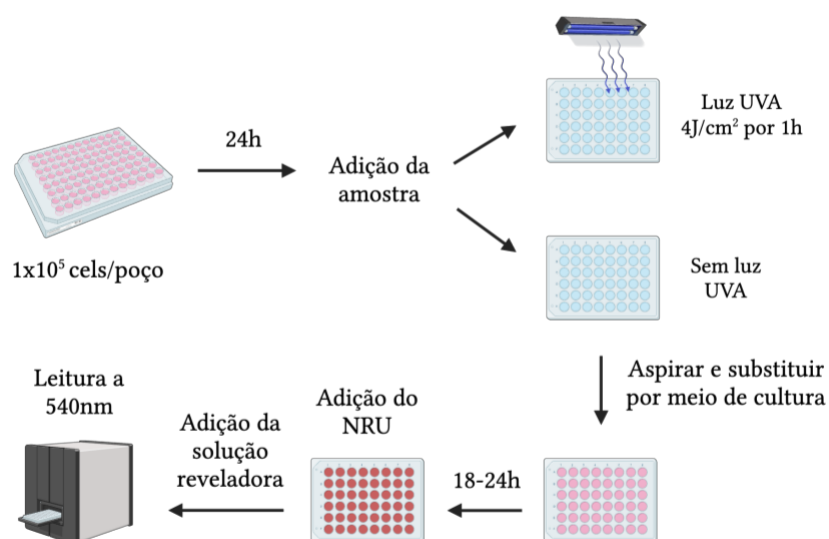
O procedimento foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade de Barcelona (UB), Espanha. Foram coletados 5 mL de sangue de humano saudável em solução anticoagulante com EDTA, e em seguida as hemácias foram isoladas por centrifugação a 3000 rpm por 10 min e lavados três vezes com uma solução tampão de fosfato isotônico (PBS) com pH 7,4 em densidade celular de 8×10^9 células/mL. (ECVAM, 2019). O método utilizado foi uma adaptação descrita por Pape et al. (2001). NG a 30 µg/mL foi adicionada a alíquotas de 25 µL de suspensão de eritrócitos em placas de 24 poços e irradiadas por 150 minutos com dose UV de 15J/cm² (1,67mW/cm²) a uma lâmpada UV (Ultra-vitalux®, Osram, Alemanha). A produção de energia da lâmpada foi verificada periodicamente antes de cada experimento com um Radiômetro Digital UVX (Ultravioleta Products Inc., San Gabriel, CA, EUA). Controles escuros foram incubados simultaneamente sem irradiação. Este período foi seguido por 30 minutos de incubação no escuro antes das medições feitas. Em seguida, as amostras foram transferidas para eppendorfs e foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. Os sobrenadantes foram transferidos para cubetas e o grau de hemólise e oxidação da hemoglobina foram detectadas por absorbância em 525 nm e 630 nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de feixe duplo Shimadzu UV-VIS 160A® (Kyoto, Japão). As porcentagens de hemólise foram determinadas por comparação com amostras de controle positivo totalmente hemolisadas com água destilada e clorpromazina (CPZ) a 60 µg/mL.

2.13.4. Teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU (OECD TG 432)

O procedimento de avaliação da fototoxicidade seguiu as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) 163, com algumas adaptações (Figura 5). A linhagem celular 3T3 foi empregada como modelos *in vitro* para prever a fototoxicidade cutânea. As células foram cultivadas por 24 horas em duas placas de 96 poços com densidades de 1×10^5 células/mL. Em seguinte, a amostra (NG) foi exposta em meio sem soro e sem fenol vermelho por 1 hora. Uma placa foi exposta a uma dose de 4 J/cm² de radiação UVA, enquanto a outra placa foi mantida no escuro. A irradiação UVA foi realizada com uma lâmpada UV (Ultra-vitalux®, Osram, Alemanha) para determinar o tempo de exposição, usando a fórmula:

$$E \text{ (J/cm}^2\text{)} = t(s) \times P \text{ (W/cm}^2\text{)} \text{ (Equação 6)}$$

onde E é a dose UV, t é o tempo expresso em segundos e, P é a potência da lâmpada. Após a exposição, o meio de tratamento foi substituído por meio de cultura, e após 24 horas, a viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de absorção de vermelho neutro (NRU). Ambos foram medidos em 550 nm após 3 horas de incubação usando um leitor de microplacas Bio-Rad 550. Para prever o potencial fototóxico, as viabilidades celulares obtidas na presença e ausência de radiação UVA foram comparadas.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 5. Fluxograma ilustrativo do teste de fototoxicidade *in vitro* com fibroblastos 3T3 utilizando o ensaio de absorção de vermelho neutro (NRU).

3.14. Análise estatística dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® versão 10.00. Os valores de IC₅₀, com intervalo de confiança de 95%, foram determinados por regressão não linear. As diferenças estatísticas entre os valores de IC₅₀ foram calculadas utilizando análise de variância unidimensional

(ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey para comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Composição química do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*

Os compostos presentes no OG, identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), estão detalhados na Tabela 4. O cromatograma correspondente é apresentado na Figura 6. Entre os compostos majoritários identificados no OG, destacam-se o β -ocimene (24%) (Figura 6A), eugenol (21%) e o germacrene D (14,5%) (Figura 6B).

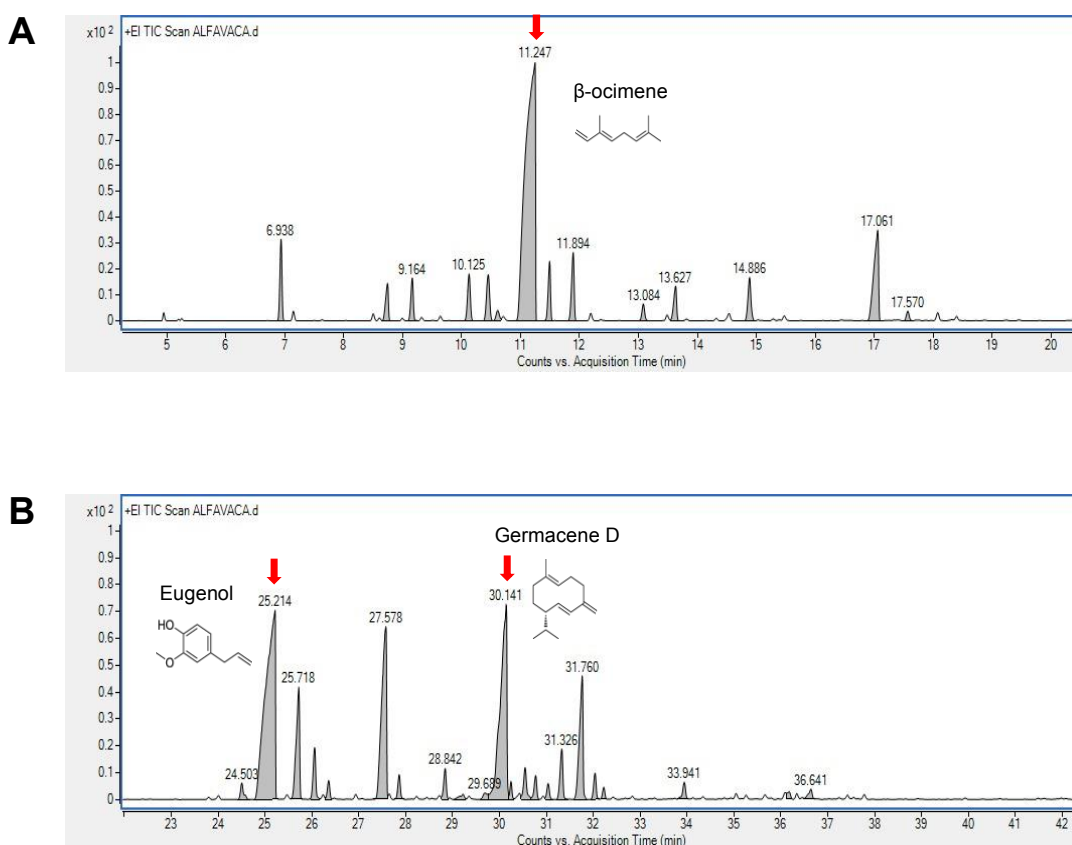


Figura 6. Cromatograma do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, do tempo 0 a 20 min (A) e do tempo 20 a 42 min (B).

Tabela 4. Composição química do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. T_r = tempo de retenção (min); IR_{calc} = índice de retenção calculado; IR_{lit} = índice de retenção da literatura; % Área = concentração relativa de cada composto em relação à área total do cromatograma.

Identificação	T_r	IR_{calc}	IR_{lit}	% Área
Thujene	6,938	926	924	1,671
1-octen-3-ol	8,741	980	974	1,007
Myrcene	9,164	992	988	1,005
Terpinene	10,125	1017	1014	1,243
Cymene	10,452	1025	1022	1,373
β-Ocimene	11,247	1044	1044	24,270
Ocimene	11,493	1050	1032	1,331
Terpinene	11,894	1060	1054	1,679
Terpinolene	13,084	1089	1086	0,441
Linalool	13,627	1102	1095	0,975
Ocimene	14,886	1130	1128	1,243
Terpinen-4-ol	17,061	1179	1174	4,068
Terpineol	17,570	1191	1186	0,261
Cubebene	24,503	1350	1348	0,597
Eugenol	25,214	1366	1356	21,010
Copaene	25,718	1378	1374	4,395
Bourbonene	26,056	1386	1387	1,588
Elemene	26,353	1393	1389	0,539
Caryophyllene	27,578	1423	1417	9,705
Copaene	27,858	1430	1430	0,717
Humulene	28,842	1454	1452	0,922
Germacrene D	30,141	1486	1480	14,596
Selinene	30,244	1488	1489	0,420
Murolene	30,771	1501	1500	0,739
Cadinene	31,326	1516	1513	1,653
Cadinene	31,760	1527	1522	5,126
Cadinene	32,224	1539	1537	0,316
Caryophyllene oxide	33,941	1583	1582	0,563
Murolol	36,184	1643	1640	0,274

3.2. Preparação da nanoemulsão

Após diversas tentativas com variações de tensoativos e diferentes proporções e concentrações entre eles e o OG, foi obtido como melhor resultado a NG composta por polissorbato 80 com EHL 15, 5% de OG, 15% de emulsificante e 80% de água.

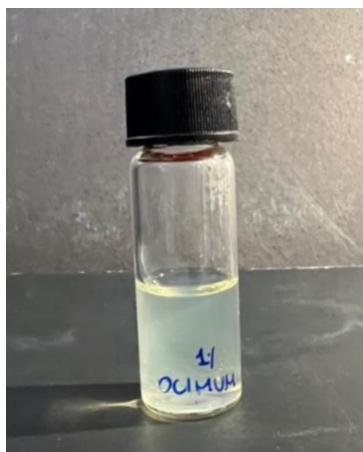
Os resultados obtidos com o uso de polissorbato 80 na solução demonstraram estabilidade na concentração de 15%. Nessas condições, as formulações apresentaram características desejáveis, como ausência de separação de fases, leve viscosidade, translucidez e coloração azulada sob luz direta, como ilustrado na Figura 7. Além disso, os testes confirmaram que não houve quebra das nanoemulsões mesmo com variações de temperatura, reforçando a robustez dessas formulações.

Com base nos resultados obtidos, as amostras foram diluídas na proporção de 1:4, alcançando uma concentração final de 1%, a qual foi empregada nas análises posteriores do estudo. A Figura 8 ilustra a imagem da nanoemulsão diluída.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 7. Imagem da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* com EHL 15.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 8. Imagem da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* a 1%.

3.3. Avaliação da estabilidade físico-química sob efeito da temperatura

A estabilidade física da NG foi avaliada em diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C e 45 °C) ao longo de 60 dias, considerando parâmetros como tamanho médio das partículas, potencial Zeta e índice de polidispersividade (PDI), conforme apresentado na Tabela 5.

	Tamanho média das partículas (nm)			Potencial Zeta (mV)			PDI (%)		
	4°C	25°C	45°C	4°C	25°C	45°C	4°C	25°C	45°C
D0	112 ± 0,9 ^{a,c}	146,3 ± 4,7 ^a	204,8 ± 4,8 ^a	-5,2 ± 0,1 ^a	-4,1 ± 0,7 ^a	-5,2 ± 0,0 ^a	0,24 ± 0,0 ^a	0,23 ± 0,0 ^a	0,20 ± 0,0 ^a
D7	101,4 ± 0,2 ^a	214,5 ± 2,4 ^b	340,1 ± 14,5 ^b	-4,2 ± 0,1 ^a	-2,9 ± 1 ^{a,b}	-5,1 ± 1,0 ^{a,b}	0,26 ± 0,0 ^a	0,24 ± 0,0 ^a	0,22 ± 0,0 ^a
D15	71,4 ± 1,9 ^b	265,0 ± 3,74 ^c	290,0 ± 3,4 ^c	-3,7 ± 0,1 ^a	-1,9 ± 1,2 ^b	-4,6 ± 0,1 ^b	0,23 ± 0,0 ^a	0,27 ± 0,0 ^a	0,26 ± 0,0 ^a
D30	118,0 ± 0,2 ^c	340,2 ± 9,33 ^d	247,8 ± 6,3 ^d	-2,3 ± 0,3 ^b	-1,2 ± 0,4 ^c	-3,4 ± 1,3 ^b	0,23 ± 0,0 ^a	0,26 ± 0,0 ^a	0,24 ± 0,0 ^a
D60	101,0 ± 11 ^a	333,3 ± 4,5 ^d	50,2 ± 4,5 ^e	-4,1 ± 0,4 ^{a,c}	-2,1 ± 0,5 ^{a,b}	-4,8 ± 0,5 ^c	0,23 ± 0,0 ^a	0,26 ± 0,0 ^a	0,23 ± 0,0 ^a

Tabela 5. Análise do tamanho da partícula (nm), potencial Zeta (mV) e índice de polidispersidade (PDI) da NG durante 60 dias (D0 a D60) determinado pelo DLS nas temperaturas de 4°C, 25°C e 45°C.

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Os testes foram realizados em triplicata ($n=3$), e os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Todos os experimentos biológicos, apresentados a seguir, para avaliar a atividade da nanoemulsão foram realizados com a nanoemulsão recém-preparada, sendo utilizada no máximo até 10 dias após sua preparação. Isso

foi feito para garantir a estabilidade da nanoemulsão e a reprodutibilidade dos resultados.

3.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do OG e NG foi avaliada utilizando os métodos de captura de radicais DPPH e ABTS e os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade antioxidante determinada pelo teste do ABTS e DPPH da NG, OG e do eugenol expressos em IC₅₀.

Amostras	IC ₅₀ (µg/mL)	
	ABTS	DPPH
NG	2,65 ± 0,07 ^a	5,60 ± 0,05 ^a
OG	1,25 ± 0,06 ^b	3,33 ± 0,06 ^b
Eugenol	1,36 ± 0,34 ^b	3,05 ± 0,10 ^b

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Os testes foram realizados em duplicata ($n=2$), e os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

3.5. Ensaio de viabilidade celular

3.6. Efeitos sobre a viabilidade de fibroblastos, macrófagos e queratinócitos

Os efeitos da NG e OG sobre a viabilidade celular *in vitro* foram avaliados utilizando as linhagens celulares de fibroblastos L929, fibroblastos 3T3, macrófagos RAW 264.7 e queratinócitos HaCaT. Os resultados mostraram que, em todas as concentrações testadas (20, 10, 5 e 2,5 µg/mL), a nanoemulsão não apresentou efeitos citotóxicos nas linhagens celulares analisadas.

3.7. Determinação da atividade antioxidante intracelular *in vitro*

3.7.1. Efeito preventivo contra danos oxidativos *in vitro* causados por H₂O₂

A viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 tratados com NG e OG após exposição com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está representada na Figura 9. Os resultados demonstram que tanto o OG como a NG, nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$, exibiram efeitos protetores sobre a viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 em condições de estresse oxidativo induzido por H_2O_2 .

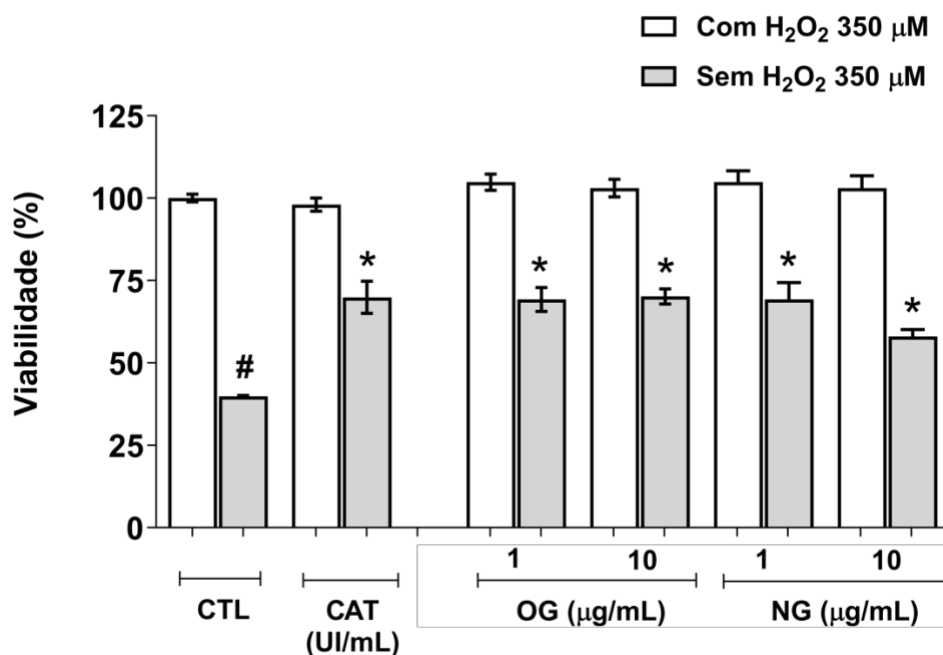


Figura 9. Efeito protetor de nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) avaliado em macrófagos contra o dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). CTL indica o controle do grupo tratado. A enzima catalase (CAT) foi usada como controle positivo. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. *($p < 0,05$) indica diferenças significativas em comparação com as células expostas apenas ao H_2O_2 . # indica diferença significativa em relação ao grupo controle sem H_2O_2 .

3.7.2. Determinação indireta de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), uma estratégia utilizada para induzir respostas inflamatórias (Figura 10). Como resultado, as concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de NG e OG demonstraram efeito significativo sobre a produção de

NO em macrófagos ativados por LPS 1 $\mu\text{g/mL}$. L-Name 10 μM foi usado como controle positivo.

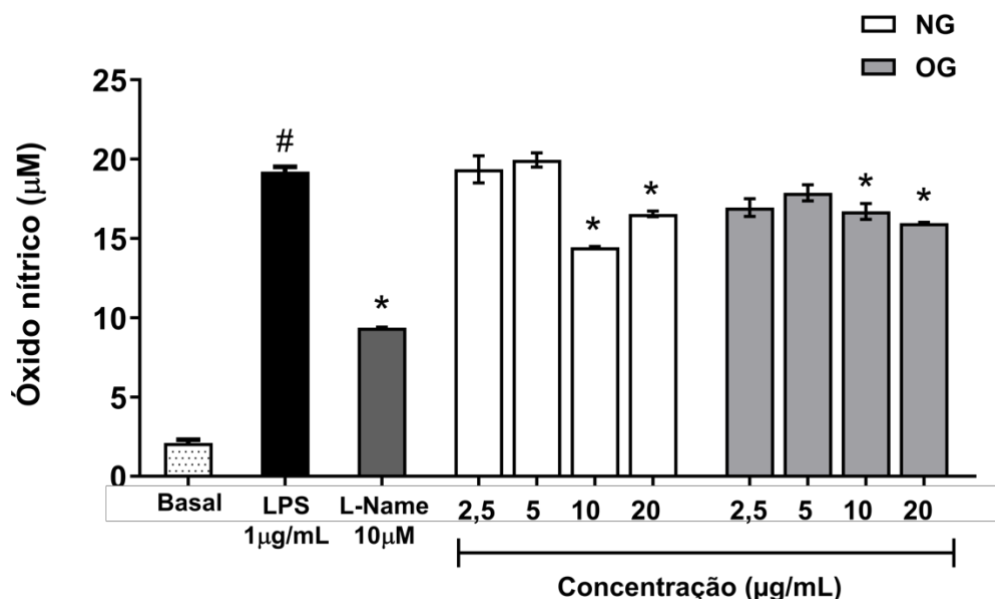


Figura 10. Efeitos inibitórios da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h de tratamento. A concentração de nitrito reflete a quantidade de óxido nítrico gerado pelas células RAW 264.7. L-Name 10 μM foi usado como controle negativo. Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. (*) indica diferença significativa em comparação com as células tratadas com LPS e, (#) diferença significativa comparada ao controle basal ($p < 0,05$).

3.7.3. Redução da produção do ânion superóxido

A análise dos resultados apresentados na Figura 11 evidencia o efeito inibitório dose dependente da NG e do OG na produção de ânion superóxido em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.

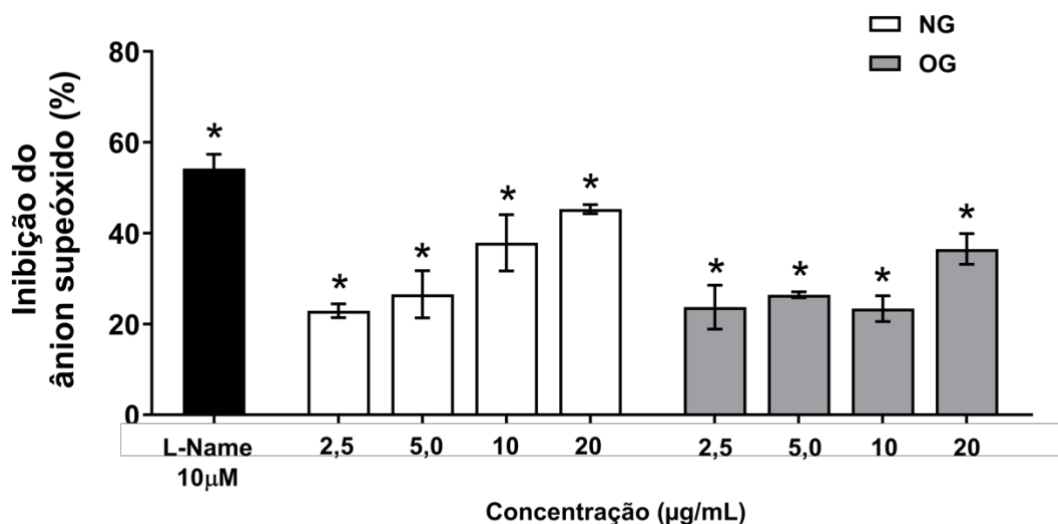


Figura 11. Efeitos inibitórios da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) sobre a produção do ânion superóxido em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 µg/mL. L-Name 10 µM foi usado como controle negativo. Os resultados são expressos como média ± DP. *($p < 0,05$) indica diferenças significativas em comparação com as células estimuladas com LPS.

3.8. Atividade anti-inflamatória *in vitro*

3.8.1. Determinação de citocinas

Os resultados apresentados nas Figuras 12, 13 e 14 demonstram os efeitos das amostras de NG e OG testados nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Enquanto o OG foi capaz de inibir apenas a produção de TNF- α na concentração de 5 µg/mL, a NG apresentou efeito inibitório sobre a produção de IL-6, TNF- α e IL-1 na mesma concentração.

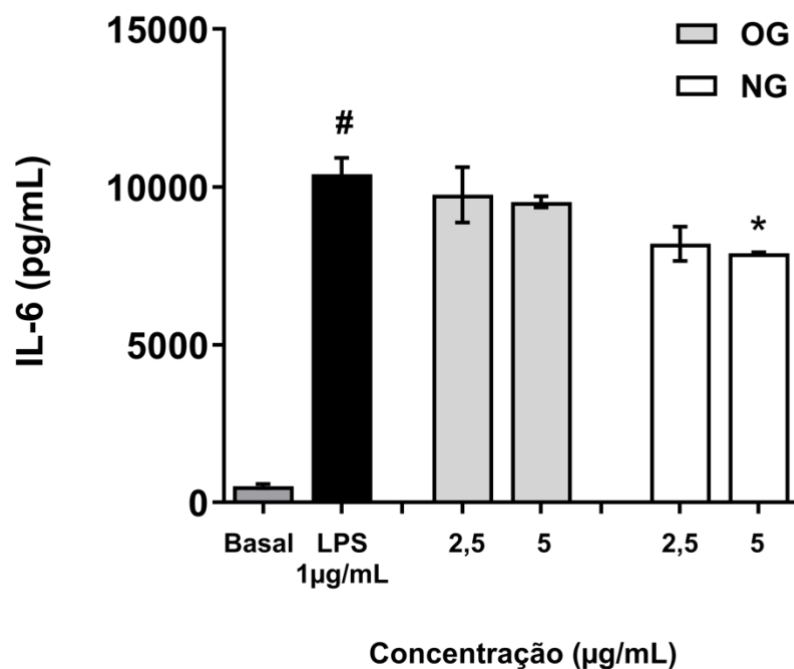


Figura 12. Efeito da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL sobre a concentração da citocina pró-inflamatórias IL-6 em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 µg/mL após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média ± DP. Significância estatística para $p < 0,05$. (#) Grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. (*) Grupo tratado comparado ao grupo LPS.

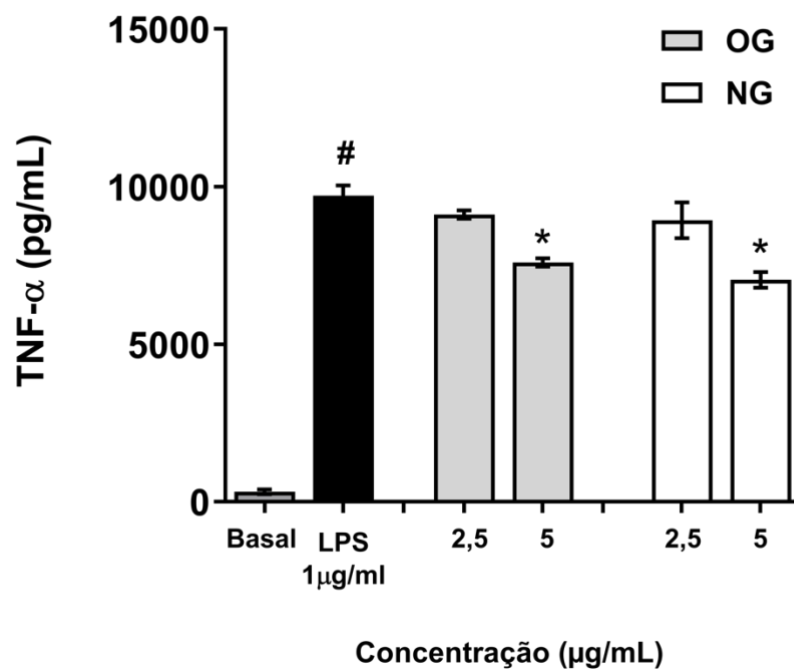


Figura 13. Efeito da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL sobre a concentração da citocina pró-inflamatórias TNF-α em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 µg/mL após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média ± DP. Significância estatística para $p < 0,05$. (#) Grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. (*) Grupo tratado comparado ao grupo LPS.

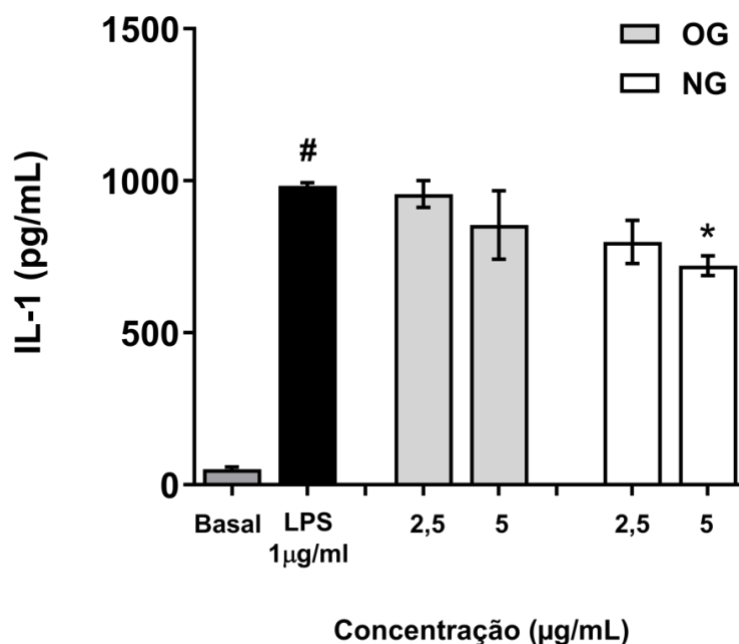


Figura 14. Efeito da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL sobre a concentração da citocina pró-inflamatórias IL-1 em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) 1 µg/mL após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP. Significância estatística para $p < 0,05$. (#) Grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. (*) Grupo tratado comparado ao grupo LPS.

3.9. Atividade proliferativa celular (BrdU)

Os resultados apresentados na Figura 15 indicam que tanto NG quanto OG promoveram um aumento significativo na atividade proliferativa dos fibroblastos nas concentrações de 10 e 20 µg/mL.

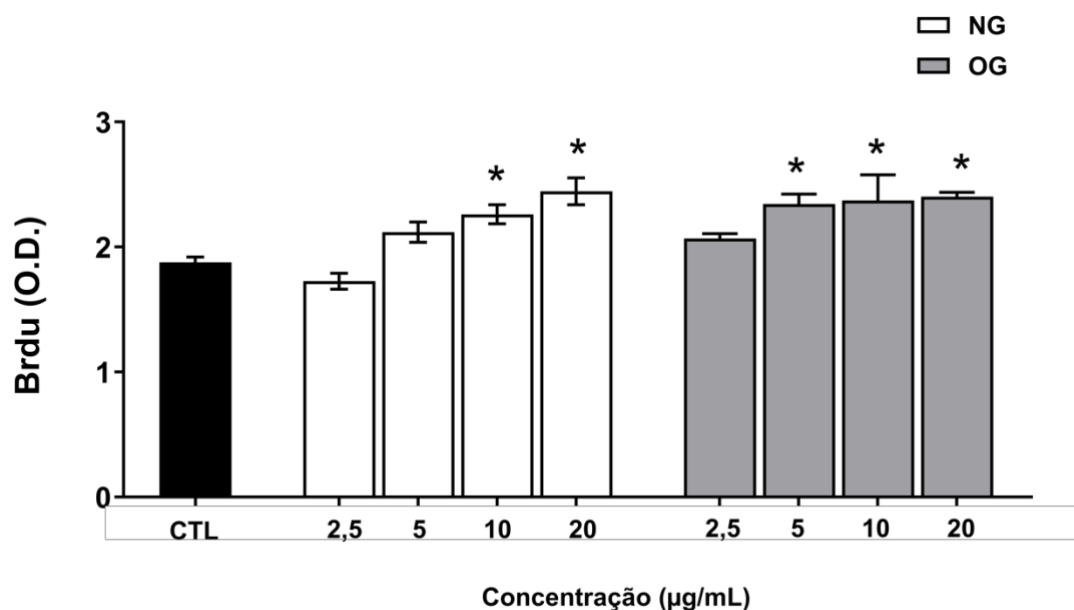


Figura 15. Efeito proliferativo em cultura de fibroblastos avaliado pelo ensaio BrdU da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) nas concentrações de 2,5 a 20 µg/mL. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (CTL) ($p < 0,05$).

3.10. Ensaio de migração celular (*Scratch assay*)

Os resultados do ensaio de migração celular apresentados na Figura 16, demonstram que tanto NG quanto OG, na concentração de 20 µg/mL, promoveram uma redução expressiva da área em comparação ao grupo controle (células não tratadas) após 16 horas. As imagens ilustram a lesão artificial criada na monocamada de fibroblastos inicialmente (0h) e sua redução ao longo do tempo (16h), evidenciando o efeito positivo das formulações no estímulo à migração celular.

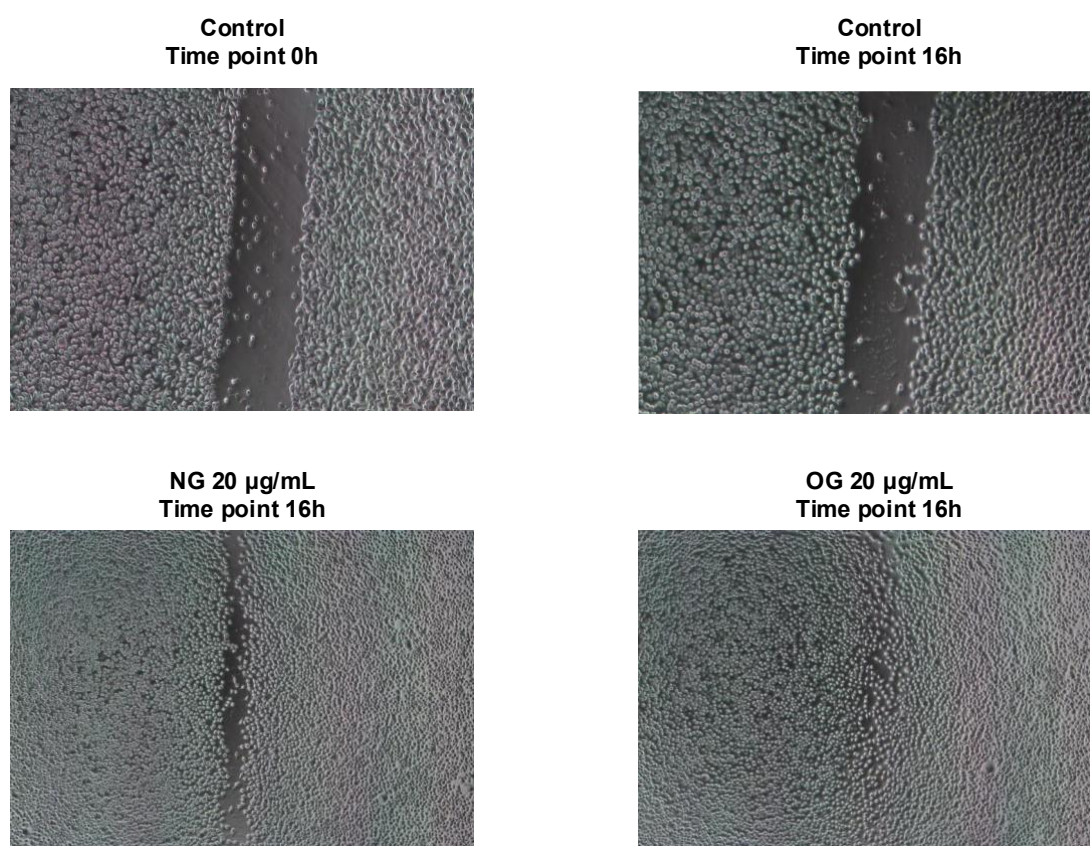


Figura 16. Imagens representativas dos efeitos sobre a migração celular de fibroblastos pela nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) e óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) (20 µg/mL) após 16 horas comparada ao controle no tempo 0h.

3.11. Ensaio da inibição da tirosinase

Os resultados obtidos no teste de inibição da tirosinase com OG indicam que a atividade inibitória da enzima é dependente da concentração do composto testado (Figura 17). As concentrações mais altas, de 100 µg/mL e 10 µg/mL, demonstraram inibição significativa da tirosinase, com percentuais próximos ao controle positivo (ácido kójico a 125 µg/mL). Por outro lado, concentrações menores, como 1 µg/mL e 0,1 µg/mL, apresentaram uma redução acentuada na atividade inibitória, reforçando a relação direta entre a concentração da nanoemulsão e sua eficácia.

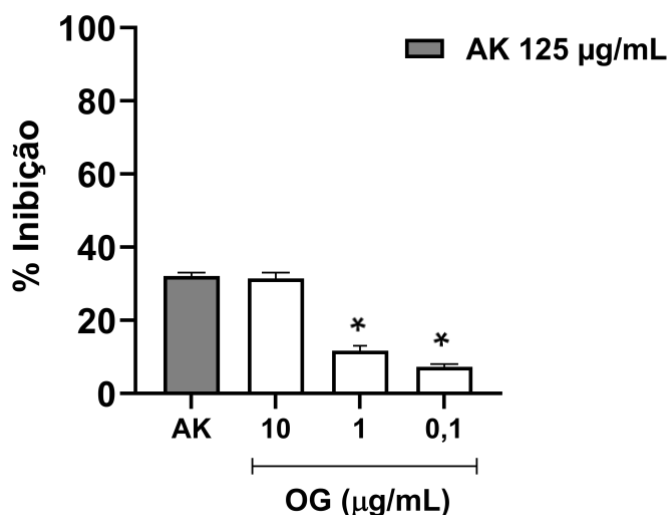


Figura 17. Percentual de inibição da atividade da tirosinase pelo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OG) em diferentes concentrações (10, 1 e 0,1 µg/mL) comparado ao ácido kójico (AK 125 µg/mL, controle positivo). (*) indica diferença significativa em comparação com as células tratadas com AK.

3.12. Métodos alternativos de segurança *in vitro* ao uso de animais

3.12.1. Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio de HET-CAM

O ensaio de HET-CAM foi utilizado para avaliar o potencial de irritação ocular, e os resultados dessa classificação, juntamente com os valores médios e os desvios padrão obtidos, estão apresentados na Tabela 7 correspondentes às formulações testadas.

Os resultados dos controles confirmaram a eficiência do método alternativo na avaliação da irritabilidade, conforma mostrado na Figura 18. Como o esperado, a solução de NaCl 0,9% (controle negativo) não produziu respostas visuais, sendo classificada como não irritante ($IS = 0,0 \pm 0,0$). Os controles positivos, SDS 1% ($IS = 19,46 \pm 1,66$) e NaOH 0,1N ($IS = 18,36 \pm 0,45$), induziram hiperemia e hemorragia, sendo classificados como muito irritantes.

NG e seu controle branco (nanoemulsão sem OG) foram classificados como irritantes moderados, com índices de $7,8 \pm 5,43$ e $8,35 \pm 2,45$,

respectivamente, porém apresentaram-se menos irritantes em comparação aos controles positivos.

Tabela 7. Efeitos da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* sobre o potencial de irritação ocular pelo ensaio de HET-CAM classificados quanto ao IS (irritation score).

Formulação	IS	Classificação
NG	7,8 ± 5,43	Irritante moderado
NG branco	8,35 ± 2,45	Irritante moderado
NaCl 0,9%	0,0 ± 0,0	Não Irritante
SDS 1%	19,46 ± 1,66	Muito irritante
NaOH 0,1N	18,36 ± 0,45	Muito irritante

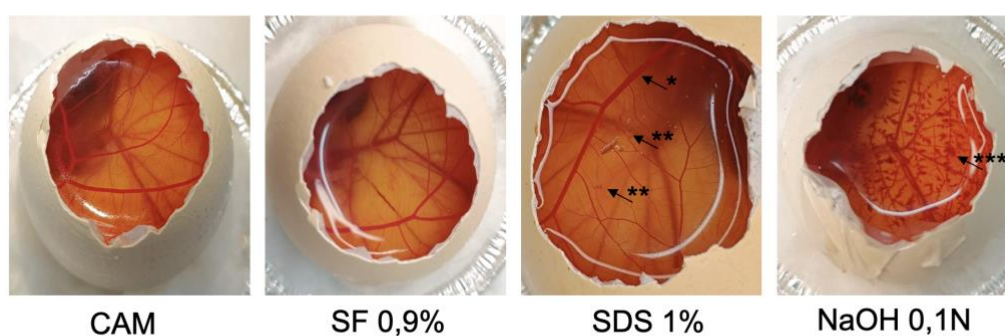


Figura 12. Imagens representativas dos efeitos na membrana cório-alantóide (HET-CAM) após tratamento com diferentes controles. CAM: membrana sem tratamento (controle negativo); SF 0,9%: solução fisiológica (controle negativo); SDS 1%: lauril sulfato de sódio a 1% (controle positivo irritante); NaOH 0,1N: solução de hidróxido de sódio a 0,1N (controle positivo irritante). Os sinais observados incluem (*) hiperemia, (**) hemorragia e (***) coagulação.

3.12.2. Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio CAM-TBS

A avaliação semi-quantitativa do potencial de irritação ocular da NG determinada pelo ensaio do CAM-TBS não demonstrou nenhum efeito irritante.

Os resultados dos controles confirmaram a eficiência do método alternativo na avaliação da irritabilidade, conforma mostrado na Tabela 8. Como esperado, a solução de NaCl 0,9% (controle negativo) não demonstrou efeito irritante, e os controles positivos, SDS 1% e NaOH 0 demonstraram irritabilidade.

Tabela 8. Efeitos da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) sobre o potencial de irritação ocular pelo ensaio de CAM-TBS.

Formulação	Corante absorvido (μg)	Classificação
NG	$3,45 \times 10^5$	Não irritante/irritante leve
NG branco	$3,3 \times 10^5$	Não irritante/irritante leve
NaCl 0,9%	$2,85 \times 10^5$	Não irritante/irritante leve
SDS 1%	$9,15 \times 10^5$	Moderadamente irritante
Solução NaOH 0,1N	$8,45 \times 10^5$	Moderadamente irritante

3.12.3. Teste de fotohemólise em glóbulos vermelhos (Photo-RBC)

Os resultados dos efeitos hemolíticos da NG são apresentados na Figura 19. A NG apresentou um percentual de hemólise consideravelmente reduzido em comparação aos controles positivos, tanto na ausência quanto na presença de radiação UVA. O grupo NG branco demonstrou altos índices de hemólise, aproximando-se dos valores observados para o controle positivo com água destilada (H_2O). A exposição à radiação UVA não aumentou significativamente a hemólise induzida pela NG, mantendo-se abaixo dos valores observados para a clorpromazina (CPZ), que apresentou efeito hemolítico expressivo. A análise estatística indicou diferenças significativas entre os grupos testados.

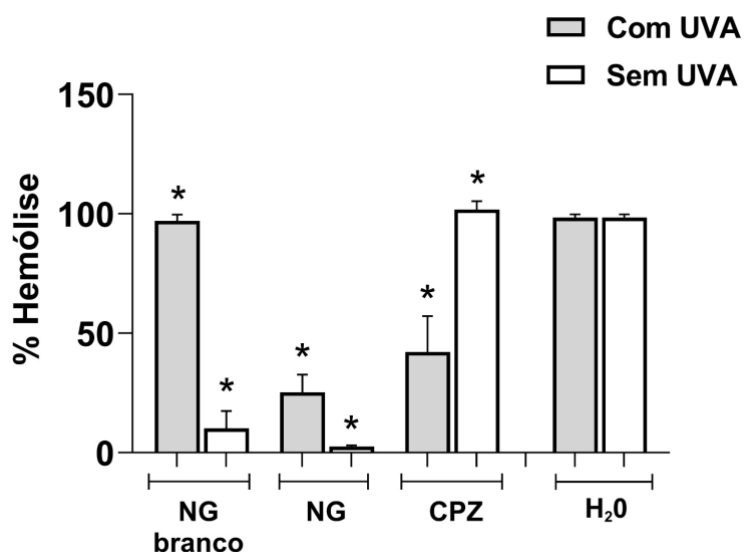


Figura 19. Efeito hemolítico da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) sob exposição (barras cinzas) e ausência de exposição (barras brancas) à radiação UVA (4 J/cm²). A avaliação de hemólise foi conduzida para NG (30 µg/mL), nanoemulsão sem óleo essencial (NG branco), água destilada (H₂O, controle positivo) e clorpromazina (CPZ, 60 µg/mL, controle positivo). Resultados apresentados como média ± DP de experimentos realizados em triplicata. Análise estatística conduzida por ANOVA seguida de teste de Tukey.

3.12.4. Efeitos da fototoxicidade da nanoemulsão sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3

A fototoxicidade da nanoemulsão foi avaliada em fibroblastos de camundongo 3T3 por meio do ensaio de vermelho neutro (NRU). Os resultados obtidos indicaram que a NG não apresentou efeitos fototóxicos nas concentrações avaliadas (1 e 10 µg/mL), com e sem exposição à radiação UVA (4 J/cm²) Figura 20).

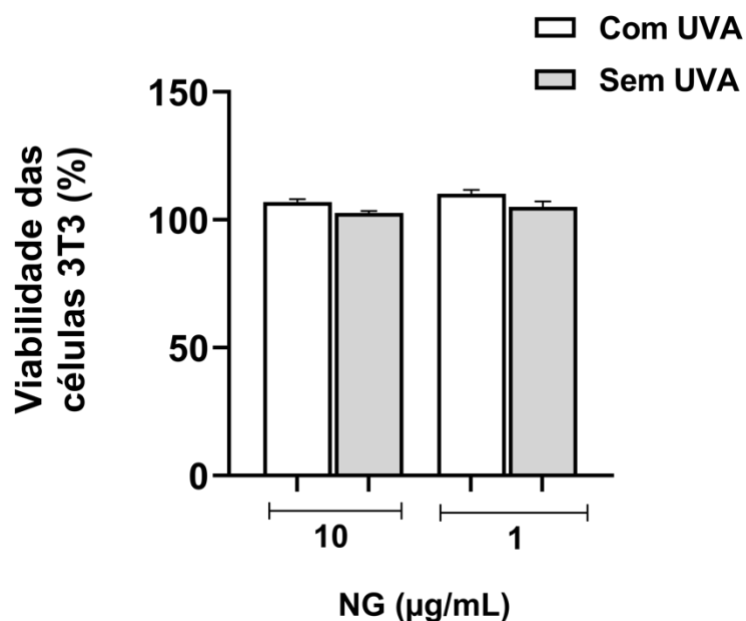


Figura 20. Efeito fototóxico da nanoemulsão de *Ocimum gratissimum* (NG) em fibroblastos 3T3 com e sem exposição à radiação UVA (4 J/cm²). A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de vermelho neutro (NRU) após tratamento com NG em diferentes concentrações (1 e 10 µg/mL). Resultados expressos como média ± DP de experimentos realizados em triplicata.

4. DISCUSSÃO

A crescente demanda por formulações cosméticas mais eficazes tem impulsionado o desenvolvimento de sistemas avançados de liberação, como as nanoemulsões, reconhecidas por sua capacidade de aprimorar a estabilidade, biodisponibilidade e desempenho biológico de compostos bioativos (Singh e Pulikkal, 2022). Este estudo apresenta uma abordagem inovadora ao explorar o potencial da nanoemulsão como estratégia para otimizar a biodisponibilidade e estabilidade do OG, avaliando sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e seu efeito cicatrizante.

A análise química revelou que os compostos majoritários do OG foram β-ocimeno, germacreno D e eugenol, respectivamente, demonstrando uma composição diversificada, uma vez que a literatura geralmente aponta o eugenol como o principal constituinte dessa espécie. Essa variação pode estar relacionada a fatores genéticos, morfológicos e ambientais, como local de

cultivo, clima e método de extração (Chimnoi et al., 2018). Dentre os compostos identificados, β -ocimeno e germacreno D pertencem à classe dos terpenos, enquanto o eugenol, um fenilpropanoide, se destaca por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias (Miranda et al., 2016; Barboza et al., 2018).

A caracterização físico-química das nanoemulsões é essencial para garantir sua estabilidade e eficácia biológica. O tamanho das partículas influencia diretamente na permeação cutânea do ativo e sua biodisponibilidade tópica, impactando na eficácia terapêutica da formulação (Singh et al., 2017). Além disso, o índice de polidispersidade (PDI) reflete a uniformidade na distribuição das partículas e o potencial Zeta determina a carga elétrica na superfície, sendo, portanto, um indicador da estabilidade coloidal da nanoemulsão (Patel et al., 2011; Wu et al., 2018).

A NG apresentou um PDI baixo ($<0,3$), indicando alta uniformidade das partículas, e um potencial Zeta negativo, reforçando sua estabilidade coloidal. O tamanho das partículas manteve-se dentro da faixa recomendada para nanoemulsões (10-500 nm) (Mushtaq et al., 2023), sendo 4°C a condição mais estável ao longo de 60 dias, com um aumento progressivo e controlado do tamanho das partículas. Em 45°C, observou-se variação no tamanho das partículas, sugerindo reorganização molecular e instabilidade, possivelmente pelo amadurecimento de Ostwald, fenômeno que promove o crescimento de gotículas maiores pela migração de moléculas de gotículas menores, causando instabilidade da emulsão em altas temperaturas (Chuacharoen et al., 2019). Assim, 4°C foi a melhor temperatura de armazenamento, garantindo maior estabilidade para aplicações cosméticas e terapêuticas.

Tanto o OG quanto NG demonstraram capacidade sequestradora de radicais livres, evidenciando a preservação do efeito antioxidante mesmo após o processo de nanoencapsulação. No entanto, diferentemente dos estudos de Soundararajan et al. (2021) e Araujo et al. (2021), que relataram um aumento na atividade antioxidante com a nanoencapsulação de óleos essenciais, nossos resultados não indicaram essa potencialização. Apesar disso, destaca-se que não houve perda da atividade antioxidante, o que é um aspecto relevante para o desenvolvimento de formulações cosméticas, garantindo a estabilidade funcional do óleo essencial.

O estresse oxidativo está relacionado a processos inflamatórios, envelhecimento cutâneo e danos celulares, o que torna seu controle fundamental para o desenvolvimento de formulações antioxidantes eficazes (Huyut et al., 2017). Ensaio intracelulares, que avaliam os efeitos sobre a produção ou inibição de óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e a proteção contra danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são amplamente utilizados para avaliar o potencial antioxidante e auxiliar no controle dessas espécies reativas (Soares et al., 2021).

Tanto NG quanto OG demonstraram efeitos de proteção contra danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 e capacidade de reduzir os níveis de NO e $O_2^{\bullet-}$ indicando que a nanoencapsulação preservou os efeitos antioxidantes do óleo essencial, reforçando seu potencial na modulação do estresse oxidativo. Estudos prévios sugerem que compostos fenólicos e terpenos presentes nos óleos essenciais podem modular essa resposta, contribuindo para a redução do estresse oxidativo e minimização dos danos celulares (Castro et al., 2022; Shen et al., 2022).

No processo inflamatório, a ativação de células imunológicas, como macrófagos, resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-1, que amplificam a resposta inflamatória e favorecem danos celulares (Arulselvan et al., 2016). Em nosso estudo, a avaliação da atividade anti-inflamatória revelou um achado crucial: NG demonstrou uma eficácia superior a OG promovendo uma redução significativa de TNF- α , IL-6 e IL-1, enquanto o OG apresentou efeito significativo apenas na redução do TNF- α . Esse resultado destaca o potencial da nanoencapsulação como uma estratégia promissora não apenas para preservar sua estabilidade, protegendo os compostos bioativos da degradação e volatilização, mas também para potencializar os efeitos farmacoterapêuticos do óleo essencial (Yan et al., 2024).

A literatura indica que o eugenol, principal componente do OG, modula a resposta inflamatória através da inibição da via NF- κ B, reduzindo TNF- α e IL-6 (Chimnoi et al., 2018). No caso da NG, os efeitos anti-inflamatórios podem ter sido amplificados pela liberação controlada e sustentada dos compostos ativos. Além disso, os terpenos presentes no óleo essencial também contribuem para

a modulação da inflamação, como demonstrado no estudo de Marques et al. (2019), que relataram a redução de TNF- α e IL-1 α pelos terpenos.

A saúde e integridade da pele dependem de mecanismos celulares nos quais os fibroblastos são essenciais, pois são responsáveis por produzir colágeno e promover o reparo tecidual. Portanto, alterações nos fibroblastos podem comprometer a estrutura da pele (Nilforoushzadeh et al., 2022). Tanto a NG quanto o OG demonstraram efeito significativo na proliferação de fibroblastos, sugerindo que seus compostos bioativos modulam vias de sinalização no reparo tecidual, semelhante ao observado para o óleo essencial de *Artemisia montana* (Yoon et al., 2014). Ambas as amostras também favoreceram o fechamento da ferida pela migração dos fibroblastos, com destaque para o fechamento em 16 horas, superando outros estudos como o de Antonescu et al. (2021), que relataram fechamento completo em 48 horas. Estudos anteriores indicam que compostos fenólicos e terpenos desempenham um papel relevante na modulação da migração celular, favorecendo um fechamento mais rápido de feridas (Fronza et al., 2009).

De forma inédita, o OG foi avaliado quanto ao seu potencial clareador, tendo como base a inibição da tirosinase, um dos principais mecanismos reguladores da produção de melanina. Essa característica é particularmente relevante para formulações cosméticas voltadas à uniformização do tom da pele e ao tratamento de hiperpigmentações (Baber et al., 2023).

Os resultados do ensaio de inibição da tirosinase indicaram que o OG apresentou uma excelente atividade inibitória enzimática de forma dose-dependente com percentual de inibição próximo ao ácido kójico, porém em concentrações 10x menores. Essa inibição enzimática pode estar associada à presença de compostos fenólicos, que possuem estrutura química semelhante à tirosina e podem competir pelo sítio ativo da enzima, impedindo a oxidação completa da tirosina e, conseqüentemente, reduzindo a síntese de melanina (Vieira et al., 2015). Esses achados sugerem um possível potencial despigmentante e clareador do OG. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar seu mecanismo de ação, especialmente na forma nanoestruturada.

Para garantir a segurança das formulações cosméticas antes da comercialização, é essencial realizar avaliações rigorosas para prevenir danos

à pele, como irritações, sensibilizações, toxicidade celular e reações adversas à radiação UV. Formulações inadequadas podem comprometer a pele, resultando em inflamações, danos oxidativos e alterações na matriz extracelular. Assim, os testes de segurança são fundamentais para assegurar a tolerabilidade dos produtos, proteger os consumidores e atender às regulamentações sanitárias (Chorilli et al., 2009; Brasil, 2012).

Os métodos *in vitro* desempenham um papel crucial nesse processo, pois permitem avaliar potenciais efeitos adversos sem a necessidade de testes em animais, alinhando-se às diretrizes éticas e regulatórias globais. Testes como o HET-CAM e CAM-TBS são utilizados para avaliar a irritabilidade ocular e cutânea, enquanto ensaios de fototoxicidade, utilizando fibroblastos 3T3, determinam a segurança da exposição do produto à luz UV. A avaliação da fotohemólise também é um parâmetro crucial, pois permite identificar danos aos eritrócitos induzidos pela luz, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos nas membranas celulares dos eritrócitos e resultam em hemólise (Brasil, 2012).

Nesse estudo, a NG apresentou irritabilidade baixa no CAM-TBS, enquanto no ensaio HET-CAM apresentou irritabilidade moderada. Essa diferença pode estar relacionada ao alto percentual do emulsificante utilizado (15%) e às possíveis limitações na concentração testada. Surfactantes como o polissorbato 80 amplamente empregados em nanoemulsões devido à sua capacidade de reduzir a tensão interfacial e estabilizar o sistema podem comprometer a integridade da barreira cutânea, causando irritação (Salomon e Giordano-Labadie, 2022). Assim, em formulações tópicas destinadas à pele, seu uso na região dos olhos deve ser evitado, especialmente em produtos cosméticos de aplicação periorbital.

A avaliação da hemólise é crucial para determinar a biocompatibilidade de formulações nanoestruturadas, sendo um método amplamente utilizado para estimar a toxicidade de surfactantes e formulações. Esse ensaio ajuda a prever danos aos eritrócitos *in vivo*, que podem levar a efeitos adversos sistêmicos, especialmente em produtos tópicos (Aparicio et al., 2005). No presente estudo, a NG mostrou um percentual de hemólise reduzido em comparação aos controles positivos, indicando um perfil de segurança adequado. Além disso, a exposição à radiação UVA não aumentou

significativamente a hemólise induzida pela NG, demonstrando seu potencial protetor contra a luz e sua estabilidade frente à radiação. Esses resultados sugerem que a nanoemulsão tem baixa propensão a gerar espécies reativas de oxigênio, minimizando danos às membranas celulares e tornando-a mais segura para aplicações tópicas.

A fototoxicidade é uma reação cutânea aguda desencadeada pela interação entre uma substância química e a exposição à radiação ultravioleta (UV) ou visível, resultando em danos celulares na área exposta (Chorilli et al., 2009). No presente estudo, a segurança da NG foi avaliada por meio de testes *in vitro* de irritabilidade e fototoxicidade, sendo pioneira na avaliação desses parâmetros para esta formulação. A análise da fototoxicidade em fibroblastos 3T3 demonstrou que a nanoemulsão não induziu efeitos tóxicos significativos após exposição à radiação UV, sugerindo que sua composição rica em antioxidantes pode conferir proteção contra danos oxidativos (Gupta, 2015).

Esses achados corroboram estudos anteriores, como o de Zanatta et al. (2010), que relataram ausência de fototoxicidade em emulsões contendo óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*), efeito atribuído à presença de compostos antioxidantes. De maneira semelhante, nanoemulsões formuladas com óleo de *Punica granatum* demonstraram capacidade de proteger queratinócitos HaCaT contra danos ao DNA induzidos por UVB (Baccarin et al., 2015).

Dessa forma, os resultados obtidos indicam a segurança da formulação e seu potencial para aplicações tópicas. No entanto, a irritabilidade moderada no ensaio HET-CAM sugere a necessidade de ajustes na concentração ou no sistema emulsificante. Além disso, a ausência de testes *in vivo* e de investigações sobre estabilidade a longo prazo reforça a importância de estudos adicionais para validar o uso seguro e eficaz da NG em formulações cosméticas.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo pioneiro desenvolveu e caracterizou a NG avaliando sua estabilidade, segurança e propriedades biológicas. A análise da composição química do OG revelou a predominância de terpenos e compostos fenólicos, substâncias amplamente reconhecidas por suas potentes atividades

biológicas. A formulação desenvolvida demonstrou estabilidade adequada, evidenciada por métodos de caracterização físico-química, com ênfase nos testes realizados à temperatura de 25°C, o que assegura sua viabilidade para aplicações cosméticas e terapêuticas em condições ambientais típicas.

Nos testes *in vitro* de atividade biológica, tanto o óleo essencial quanto a nanoemulsão apresentaram efeitos antioxidantes significativos. No entanto, a análise da atividade anti-inflamatória relevou um achado relevante, na qual a NG mostrou eficácia superior à OG, reduzindo significativamente os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1, enquanto a OG apresentou um efeito significativo apenas na diminuição do TNF- α . Esse desempenho superior reflete a potencialização dos efeitos anti-inflamatórios pela formulação nanoestruturada, que proporcionou uma liberação mais controlada e direcionada dos bioativos. A avaliação dos efeitos sobre fibroblastos mostrou que tanto OG quanto NG promoveram aumento da proliferação e migração celular, sugerindo potencial para o tratamento de cicatrizes e estímulo à regeneração celular. O OG também demonstrou inibição significativa da tirosinase, sugerindo um possível efeito clareador. Entretanto, a nanoemulsão não foi testada nesse ensaio, o que abre oportunidade para investigações futuras sobre seu potencial clareador.

A avaliação de segurança revelou que a nanoemulsão não apresentou fototoxicidade e teve baixo efeito hemolítico, indicando boa biocompatibilidade. No entanto, a irritabilidade moderada observada no ensaio HET-CAM sugere que ajustes na concentração ou na formulação podem ser necessários para minimizar possíveis reações adversas, especialmente em produtos destinados à área dos olhos.

Em resumo, os resultados obtidos demonstraram que a nanoemulsão formulada com OG apresentou maior estabilidade e eficácia biológica em comparação ao óleo essencial isolado, corroborando a hipótese proposta. A nanoemulsão se destacou, principalmente, por manter a estabilidade química e proteger os compostos ativos contra degradação oxidativa e térmica, o que se reflete na conservação das propriedades biológicas do óleo, com ênfase em sua superior atividade anti-inflamatória. Isso evidencia seu grande potencial para aplicações cosméticas e terapêuticas, oferecendo uma forma mais estável e eficaz de liberar os compostos bioativos. No entanto, são necessários estudos adicionais para validar sua eficácia em modelos mais complexos, avaliar sua

estabilidade a longo prazo e otimizar sua formulação, assegurando sua segurança e eficácia em produtos cosméticos.

6. REFERÊNCIAS

1. Adams, R. P. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver, TX USA: Texensis Publishing.
2. Antonescu, A. I., Miere, F., Fritea, L., Ganea, M., Zdrinca, M., Dobjanschi, L. & Cavalu, S. (2021). Perspectives on the combined effects of *Ocimum basilicum* and *Trifolium pratense* extracts in terms of phytochemical profile and pharmacological effects. *Plants*, 10(7), 1390.
3. Antunes, S. F. & Backx, B. P. (2020). Nanotecnologia e seus impactos na sociedade. *Revista Tecnologia e Sociedade*, 16(40), 1-15.
4. Aparicio, R. M., García-Celma, M. J., Vinardell, M. P., & Mitjans, M. (2005). In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39(5), 1063-1067.
5. Araujo, T. D. S., da Costa, J. M. A. R., Ribeiro, F. D. O. S., de Jesus Oliveira, A. C., do Nascimento Dias, J., de Araujo, A. R., & de Souza, B. W. S. (2021). Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 100-108.
6. Arulselvan, P., Tan, W. S., Gothai, S., Muniandy, K., Fakurazi, S., Esa, N. M. & Kumar, S. S. (2016). Anti-inflammatory potential of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in downregulating the NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Molecules*, 21(11), 1452.
7. Ashaolu, T. J. (2021). Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3381-3395.
8. Baber, M. A., Crist, C. M., Devolve, N. L., & Patrone, J. D. (2023). Tyrosinase Inhibitors: A Perspective. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(15), 5762.
9. Baccarin, T., Mitjans, M., Ramos, D., Lemos-Senna, E., & Vinardell, M. P. (2015). Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 153, 127-136.
10. Basketter, D., Alépée, N., Casati, S., Crozier, J., Eigler, D., Griem, P. & Rossi, L. H. (2013). Skin sensitisation—moving forward with non-animal testing strategies for regulatory purposes in the EU. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 67(3), 531-535.

11. Bhattacharjya, D., Adhikari, S., Biswas, A., Bhuimali, A., Ghosh, P., & Saha, S. (2019). *Ocimum* phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemicals in human health*, 23, 1-26.
12. Barboza, JN, da Silva Maia Bezerra Filho, C., Silva, RO, Medeiros, JVR, & de Sousa, DP (2018). Uma visão geral sobre o potencial anti-inflamatório e perfil antioxidante do eugenol. *Medicina oxidativa e longevidade celular*, 2018 (1), 3957262.
13. Bizzo, H. R., & Rezende, C. M. (2022). O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. *Química Nova*, 45, 949-958.
14. Blanco-Padilla, A., Soto, K. M., Hernández Iturriaga, M., & Mendoza, S. (2014). Food antimicrobials nanocarriers. *The Scientific World Journal*, 2014(1), 837215.
15. Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24(2-3), 119-124.
16. Borges, R. S., Keita, H., Ortiz, B. L. S., dos Santos Sampaio, T. I., Ferreira, I. M., Lima, E. S., ... & Carvalho, J. C. T. (2018). Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: *in vitro* and in zebrafish studies. *Inflammopharmacology*, 26(4), 1057-1080.
17. Bradlaw, J. A., & Wilcox, N. L. (1997). Workshop on eye irritation testing: practical applications of non-whole animal alternatives. *Food and Chemical Toxicology*, 35(1), 1-11.
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília: Anvisa, 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa>. Acesso em: 10 nov. 2024.
19. Brasil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais e cria o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 19 nov. 2024.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Brasília: ANVISA, 2004, v.1, 45 p. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa>. Acesso em: 15 set. 2024.
21. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade feira. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>. Acesso em: 20 ago. 2024.
22. Cadioli, L. P., & Salla, L. D. (2006). Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. *Revista de Ciências exatas e tecnologia*, 1(1), 98-105.
23. Castro, T. N. D., Mota, M. D., & Cazedey, E. C. L. (2022). Atividade fotoprotetora e antioxidante de compostos fenólicos: uma revisão sistemática de testes *in vitro*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 51(2), 557-588.

24. Chimnoi, N., Reuk-Ngam, N., Chuysinuan, P., Khlaychan, P., Khunnawutmanotham, N., Chokchaichamnankit, D., & Techasakul, S. (2018). Characterization of essential oil from *Ocimum gratissimum* leaves: Antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 118, 290-300.
25. Chorilli, M., Tamascia, P., Rossim, C., & Salgado, H. R. N. (2009). Ensaio biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*, 19-30.
26. Chuacharoen, T., Prasongsuk, S., & Sabliov, CM (2019). Efeito das concentrações de surfactantes nas propriedades físico-químicas e na funcionalidade de nanoemulsões de curcumina sob condições relevantes para a utilização comercial. *Molecules*, 24 (15), 2744.
27. Cimino, C., Maurel, OM, Musumeci, T., Bonaccorso, A., Drago, F., Souto, EMB, & Carbone, C. (2021). Óleos essenciais: aplicações farmacêuticas e estratégias de encapsulamento em sistemas de entrega baseados em lipídios. *Farmacêutica*, 13 (3), 327.
28. CONCEA. Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 25 set. 2014. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/>. Acesso em: 20 dez. 2024.
29. CONCEA. Resolução Normativa nº 58, de 24 de maio de 2023. Dispõe sobre a proibição do uso de animais vertebrados em pesquisas relacionadas a produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes com ingredientes de segurança comprovada. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 25 maio 2023. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/>. Acesso em: 20 nov. 2024.
30. da Rocha, L. P. B., de Oliveira Alves, J. V., da Silva Aguiar, I. F., da Silva, F. H., da Silva, R. L., de Arruda, L. G., ... & da Silva, M. V. (2021). Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. *Research, Society and Development*, 10(10), e44101018282-e44101018282.
31. de Christo Scherer, M. M., Marques, F. M., Figueira, M. M., Peisino, M. C. O., Schmitt, E. F. P., Kondratyuk, T. P., & Fronza, M. (2019). Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress *in vitro*. *Journal of tissue viability*, 28(2), 94-99.
32. de Oliveira Barbosa, C., de Moraes, SM, de Sousa, HA, Martins, VC, Neto, JFC, Vieira, IGP & Carioca, JOB (2021). Composição química e potencial antioxidante de óleos essenciais de diferentes espécies de *Ocimum* (Manjerição). *Revista Brasileira de Desenvolvimento*, 7 (3), 24422-24442.
33. Echeverría, J., & Duarte Galhardo de Albuquerque, R. D. (2019). Nanoemulsions of essential oils: new tool for control of vector-borne diseases and *in vitro* effects on some parasitic agents. *Medicines*, 6(2), 42.

34. ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing), 2019. DB-ALM Protocol No. 81: Red Blood Cell (RBC) Photo Assay - Photohaemolysis and Haemoglobin Oxidation.
35. El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H. & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.
36. Fernandes, C. P., de Almeida, F. B., Silveira, A. N., Gonzalez, M. S., Mello, C. B., Feder, D., & Falcão, D. Q. (2014). Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 1-9.
37. Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., & Merfort, I. (2009). Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of ethnopharmacology*, 126(3), 463-467.
38. Grapentin, C., Barnert, S., & Schubert, R. (2015). Monitoramento da estabilidade de nanoemulsões de perfluorocarbono por análise de imagem Cryo-TEM e espalhamento dinâmico de luz. *PLoS One*, 10 (6), e0130674.
39. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, 126(1), 131-138.
40. Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
41. Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546.
42. Gupta, V., Mohapatra, S., Mishra, H., Farooq, U., Kumar, K., Ansari, M. J. & Iqbal, Z. (2022). Nanotechnology in cosmetics and cosmeceuticals—a review of latest advancements. *Gels*, 8(3), 173.
43. Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & experimental toxicology*, 34(12), 1318-1321.
44. Huyut, Z., Beydemir, Ş., & Gülçin, İ. (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry research international*, 2017(1), 7616791.
45. ICCVAM, 2006d. Current Status of *In vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane Test Method. NIH Publication No.: 06–4515. National Toxicology Program, Research Triangle Park.
46. Joshi, R. K. (2013). Chemical composition, *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum*, *O. sanctum* and their major constituents. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 75(4), 457.
47. Keifer, G., Effenberger, F., 1992. HET-CAM test protocol n° 47. *Angew. Chem. Int. Ed.* 6 (11), 951–952.

48. Kim, J. W., Lim, C. W., & Kim, B. (2017). Effects of nicotine on corneal wound healing following acute alkali burn. *PLoS One*, 12(6), e0179982.
49. Kim, S., Jeong, M., Lee, J. W., Kim, S. Y., Choi, C. K., & Kang, Y. T. (2018). Development of nanoemulsion CO₂ absorbents for mass transfer performance enhancement. *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 94, 24-31.
50. Kirk, R. G. (2018). Recovering the principles of humane experimental technique: the 3Rs and the human essence of animal research. *Science, technology, & human values*, 43(4), 622-648.
51. Koh, T. J., & DiPietro, L. A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 13, e23.
52. Kwon, D. H., Cha, H. J., Lee, H., Hong, S. H., Park, C., Park, S. H., ... & Choi, Y. H. (2019). Protective effect of glutathione against oxidative stress-induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages through activating the nuclear factor erythroid 2-related factor-2/heme oxygenase-1 pathway. *Antioxidants*, 8(4), 82.
53. Lagarto, A., Vega, R., Guerra, I., & González, R. (2006). *In vitro* quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. *Toxicology in vitro*, 20(5), 699-702.
54. Lauricella, M., Maggio, A., Badalamenti, N., Bruno, M., D'Angelo, G. D., & D'Anneo, A. (2022). Essential oil of *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* fruits exerts an antitumor effect in triplenegative breast cancer cells. *Molecular medicine reports*, 26(1), 1-10.
55. Lima, L. A., Ferreira-Sá, P. S., Garcia Jr, M. D., Pereira, V. L. P., Carvalho, J. C. T., Rocha, L., & Cruz, R. A. (2021). Nano-emulsions of the essential oil of *Baccharis reticularia* and its constituents as eco-friendly repellents against *Tribolium castaneum*. *Industrial crops and products*, 162, 113282.
56. Lindley, L. E., Stojadinovic, O., Pastar, I., & Tomic-Canic, M. (2016). Biology and biomarkers for wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 138(3S), 18S-28S.
57. Lorençoni, M. F., Figueira, M. M., e Silva, M. V. T., Schmitt, E. F. P., Endringer, D. C., Scherer, R., & Fronza, M. (2020). Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 252, 112562.
58. Marques, F. M., Figueira, M. M., Schmitt, E. F. P., Kondratyuk, T. P., Endringer, D. C., Scherer, R., & Fronza, M. (2019). *In vitro* anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway. *Inflammopharmacology*, 27, 281-289.
59. Mbuvi, M. T. E., Kungu, J. B., Gachathi, F. N., Leley, C. W. N., & Muthini, J. M. (2019). Annotated checklist of plant species of Loita Forest (Entim e Naimina Enkiyo Forest or the forest of the lost child), Narok County, Kenya. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 6(3), 54-110.

60. Menezes, P. M. N., Brito, M. C., Lucchese, A. M., de Lima, J. T., de Almeida Ribeiro, L. A., & Silva, F. S. (2017). Atividade farmacológica de óleos essenciais no sistema respiratório: uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 14(3).
61. Mihranyan, A., Ferraz, N., & Strømme, M. (2012). Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in materials science*, 57(5), 875-910.
62. Miranda, C. A. S. F., Cardoso, M. D. G., Batista, L. R., Rodrigues, L. M. A., & Figueiredo, A. C. D. S. (2016). Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Revista Ciência Agronômica*, 47, 213-220.
63. Mohr, F. B. M., Lermen, C., Gazim, Z. C., Gonçalves, J. E., & Alberton, O. (2017). Antifungal activity, yield, and composition of *Ocimum gratissimum* essential oil. *Genet. Mol. Res*, 16(1), 1-10.
64. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
65. Mushtaq, A., Wani, S. M., Malik, A. R., Gull, A., Ramniwas, S., Nayik, G. A., & Bari, A. (2023). Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. *Food Chemistry: X*, 18, 100684.
66. Nilfroushzadeh, MA, Khodaverdi Darian, E., Afzali, H., Amirkhani, MA, Razzaghi, M., Naser, R., & Zare, S. (2022). Papel dos fibroblastos de pele cultivados na dermatologia regenerativa. *Cirurgia Plástica Estética*, 46 (3), 1463-1471.
67. Nohynek, G. J., Dufour, E. K., & Roberts, M. S. (2008). Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin pharmacology and physiology*, 21(3), 136-149.
68. Nunes, S., Fruet, A. C., Rodrigues, R. V., & Vieira, J. C. (2018). Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* de um produto de administração oral contendo peptídeos de colágeno, delphinol® vitamina C e hibiscus. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, 10(3), 27-32.
69. Oliveira, A. D., Silva, R. S., Alves, E. N., Presgrave, R. D. F., Presgrave, O. A. F., & Delgado, I. F. (2012). Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation.
70. Ontao, N., Athikomkulchai, S., Tadtong, S., Leesawat, P., & Chittasupho, C. (2021). Formulation, physical and chemical stability of *Ocimum gratissimum* I. Leaf oil nanoemulsion. *Key Engineering Materials*, 901, 117-122.
71. Onwuzuligbo, A., Uronnachi, E., Onwuzuligbo, C., Umeyor, C., & Attama, A. (2024). Efficacy of Nanoemulsions Containing *Ocimum gratissimum* Essential Oil and Hibiscus Sabdariffa Extract in Malaria Treatment. *Current Nanomedicine*.
72. Ortiz-Zamora, L., Bezerra, D. C., de Oliveira, H. N. S., Duarte, J. L., Guisado-Bourzac, F., Chil-Núñez, I., & Fernandes, C. P. (2020). Preparation of non-

- toxic nano-emulsions based on a classical and promising Brazilian plant species through a low-energy concept. *Industrial Crops and Products*, 158, 112989.
73. Okoye, F. B., Obonga, W. O., Onyegbule, F. A., Ndu, O. O., & Ihekwereme, C. P. (2014). Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oils from the leaves of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). *Int J Pharm Sci Res*, 5(6), 2174-80.
 74. Pape, W. J., Maurer, T., Pfannenbecker, U., & Steiling, W. (2001). The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation programme on phototoxicity (phase II). *Alternatives to Laboratory Animals*, 29(2), 145-162.
 75. Patel, M. R., Patel, R. B., Parikh, J. R., Solanki, A. B., & Patel, B. G. (2011). Investigating effect of microemulsion components: *in vitro* permeation of ketoconazole. *Pharmaceutical development and technology*, 16(3), 250-258.
 76. Raj, S., Jose, S., Sumod, U. S., & Sabitha, M. (2012). Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(3), 186-193.
 77. Ranganatha, N., & Kuppast, I. J. (2012). A review on alternatives to animal testing methods in drug development. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(SUPPL 5), 28-32.
 78. Salomon, G., & Giordano-Labadie, F. (2022). Surfactant irritations and allergies. *European Journal of Dermatology*, 32(6), 677-681.
 79. Sanghi, R., & Singh, V. (Eds.). (2012). *Green chemistry for environmental remediation*. John Wiley & Sons.
 80. Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food chemistry*, 383, 132531.
 81. Shimizu, K., Fukuda, M., Kondo, R., & Sakai, K. (2000). The 5 α -reductase inhibitory components from heartwood of *Artocarpus incisus*: structure-activity investigations. *Planta medica*, 66(01), 16-19.
 82. Silva, F. D. A., Bizerra, A. M. C., & Fernandes, P. R. D. (2018). Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de bixa orellana L (urucum). *Holos*, 34(2), 484-498.
 83. Singh, I. R., & Pulikkal, A. K. (2022). Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review. *OpenNano*, 8, 100066.
 84. Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of controlled release*, 252, 28-49.
 85. Soares, A. D. S., Pastore, J. F. B., & Jardim, J. G. (2019). *Lamiaceae* no Rio Grande do Norte, brasil. *Rodriguésia*, 70, e03312017.
 86. Soares, A. K. C., de Sousa Júnior, A. D., Lorençon, M. F., de Castro, J. A., de Araujo Porto, F. V., Pessoa, I. S., & Fronza, M. (2021). *In vitro* and *in vivo*

- anti-inflammatory activity and chemical composition of *Renealmia petasites* Gagnep. *Inflammopharmacology*, 29, 451-465.
87. Soundararajan, V., Kandasamy, V., & Subramani, P. (2021). Antibiofilm, antioxidant and larvicidal activity of formulated nanoemulsion from *Ocimum tenuiflorum*. *Materials Today: Proceedings*, 45, 3438-3443.
 88. Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*, 8, 409-427.
 89. Sundararajan, B., Moola, A. K., Vivek, K., & Kumari, B. R. (2018). Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). *Microbial pathogenesis*, 125, 475-485.
 90. Tanko, Y., Magaji, G. M., Yerima, M., Magaji, R. A., & Mohammed, A. (2008). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of aqueous leaves extract of *Ocimum gratissimum* (Labiata) in Rodents. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(2), 141-146.
 91. Thitinarongwate, W., Nimlamool, W., Khonsung, P., Mektrirat, R., & Kunanusorn, P. (2022). Anti-inflammatory activity of essential oil from *Zingiber ottensii* Valetton in animal models. *Molecules*, 27(13), 4260.
 92. Tit, D. M., & Bungau, S. G. (2023). Antioxidant activity of essential oils. *Antioxidants*, 12(2), 383.
 93. Ugbogu, O. C., Emmanuel, O., Agi, G. O., Ibe, C., Ekweogu, C. N., Ude, V. C., & Ugbogu, E. A. (2021). A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). *Heliyon*, 7(11).
 94. Vasconcelos, SC, Régis, LA, de Menezes Filho, ACP, de Melo Cazal, C., Pereira, PS, & Christofoli, M. (2021). Composição química, atividade bactericida e antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *Ocimum basilicum* e *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 10 (8), e51810817109-e51810817109.
 95. Vieira, L. M., Castro, C. F. S., Dias, A. L. B., & Silva, A. R. (2015). Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(4), 521-527.
 96. Vinardell, M. P., Maddaleno, A. S., & Mitjans, M. (2024). Harmonizing *In vitro* Techniques for Anti-Aging Cosmetic Ingredient Assessment: A Comprehensive Review. *Cosmetics* (2079-9284), 11(5).
 97. Wu, J., Shu, Q., Niu, Y., Jiao, Y., & Chen, Q. (2018). Preparation, characterization, and antibacterial effects of chitosan nanoparticles embedded with essential oils synthesized in an ionic liquid containing system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(27), 7006-7014.
 98. Yan, Y., Wei, C., Liu, X., Zhao, X., Zhao, S., Tong, S., & Wei, Q. (2024). Formulation, Characterization, Antibacterial Activity, Antioxidant Activity, and Safety Evaluation of *Camphora longepaniculata* Essential Oil

- Nanoemulsions Through High-Pressure Homogenization. *Antioxidants*, 14(1), 33.
99. Yang Ying, Y. Y., Yang XingFen, Y. X., Zhang WenGai, Z. W., Cai JinHeng, C. J., Xue JinYu, X. J., Yang GuangYu, Y. G., & Guo Xiang, G. X. (2010). Combined *in vitro* tests as an alternative to in vivo eye irritation tests.
 100. Yoon, MS, Won, KJ, Kim, DY, Hwang, DI, Yoon, SW, Kim, B., & Lee, HM (2014). Efeito de regeneração da pele e composição química do óleo essencial de *Artemisia Montana*. *Natural product communications*, 9 (11), 1934578X1400901123.
 101. Zanatta, C. F., Mitjans, M., Urgatondo, V., Rocha-Filho, P. A. D., & Vinardell, M. P. (2010). Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 70-75.
 102. Zhang, H., Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* 8, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>
 103. Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., & Karuppayil, S. M. (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*, 18(13), 1181-1190.