

ARTIGO ORIGINAL

EFEITOS ANTI-IDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE LAVANDA, ALECRIM E MELALEUCA EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

(ANTI-AGING EFFECTS OF LAVENDER, ROSEMARY AND TEA TREE ESSENTIAL OILS ON HUMAN DERMAL FIBROBLASTS)

AUTORES: ANA CAROLINA HENRIQUES RIBEIRO MACHADO¹, DANIEL GONSALES SPÍNDOLA²,
VÂNIA RODRIGUES LEITE-SILVA¹, CARLOS ROCHA OLIVEIRA^{2,A}¹Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas - Universidade Federal de São Paulo - Diadema - São Paulo - Brasil.²Universidade Anhembi Morumbi - São Paulo - Brasil.**RESUMO**

Introdução: O envelhecimento cutâneo é um processo multifatorial que tem grande importância social. Ao longo dos anos, o poder de renovação e de combate aos radicais livres da pele diminui, acarretando numa barreira cutânea menos efetiva e com maiores danos a derme. A indústria cosmética tem desenvolvido diversos produtos para desacelerar o processo desse envelhecimento cutâneo, de forma mais efetiva e menos agressiva ao ser humano e ao meio ambiente, por meio do uso de ativos de origem vegetal. Dentre esses ativos, os óleos essenciais têm se destacado pela sua diversidade de bioativos. **Objetivos:** Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a influência dos óleos essenciais de lavanda, alecrim e melaleuca sobre a proliferação, expressão de metaloproteinases e a síntese de colágeno e de ácido hialurônico, além da atividade de colagenase em fibroblastos dérmicos humanos. **Resultados:** Os óleos essenciais de lavanda e de alecrim mostraram potencial efeito no combate as alterações cutâneas causadas no processo de envelhecimento, como promover o aumento significativo da síntese de ácido hialurônico ($p < 0,05$) e, no caso do óleo essencial de lavanda, promover o aumento significativo de colágeno total ($p < 0,05$). Além disso, os óleos essenciais de lavanda e alecrim, reduziram significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima colagenase. Por fim, os resultados demonstraram que os óleos essenciais de lavanda, alecrim reduziram significativamente ($p < 0,05$) a secreção de MMP-1, MMP-2 e MMP-9. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostraram redução na expressão de MMPs, aumento na proliferação de fibroblastos e estímulo na síntese de colágeno e de ácido hialurônico. Sugerimos que os óleos essenciais de alecrim e lavanda possam ser em formulações cosméticas destinadas à prevenção do envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: fibroblastos; colágeno; óleos essenciais.^AAutor correspondenteCarlos Rocha Oliveira – E-mail: carlos@iooe.org.br – ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8634-2850>

DOI: <https://doi.org/10.48051/rcec.v1i1.15> Artigo recebido em 16 de setembro de 2020; aceito em 30 de setembro 2020; publicado em outubro de 2020 na Revista Científica de Estética e Cosmetologia, disponível online em <http://rcec.healthsciences.com.br/>. Todos os autores contribuíram igualmente com o artigo. Os autores declaram não haver conflito de interesse. Este é um artigo de acesso aberto sob a licença CC - BY: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

ABSTRACT

Introduction: Skin aging is a multifactorial process that has great social importance. Over the years, the power to renew and fight free radicals in the local skin, resulting in a less effective skin barrier and greater damage to the dermis. The cosmetic industry has developed several products to slow down the process of this skin, in a more effective and less aggressive way to human beings and the environment, with plant-based actives. Among these actives, essential oils stand out due to the diversity of bioactives. **Objectives:** This study aimed to evaluate the influence of lavender, rosemary and tea tree essential oils on proliferation, expression of metalloproteinases and the synthesis of collagen and hyaluronic acid, in addition to the activity of collagenase in human dermal fibroblasts. **Results:** Lavender and rosemary essential oils have a potential effect in combating skin damage caused by the aging process, such as promoting significant increase in hyaluronic acid synthesis ($p < 0.05$) and, in the case of lavender essential oil, promote a significant increase in total collagen ($p < 0.05$). In addition, the essential oils of lavender and rosemary, reduced studying ($p < 0.05$) the activity of the enzyme collagenase. Finally, the results demonstrated that the essentials of lavender, rosemary reduced studying ($p < 0.05$) the secretion of MMP-1, MMP-2 and MMP-9. **Conclusion:** The results showed decrease on the MMPs expression, increased in the fibroblasts proliferation and stimulated the synthesis of collagen and hyaluronic acid. We suggest that the essential oils of rosemary and lavender can be in cosmetics formulations to prevent aging.

Keywords: fibroblasts; collagen; essential oils.

INTRODUÇÃO

O envelhecimento cutâneo é um processo biológico complexo influenciado por uma combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos [1], definido como o acúmulo de dano molecular produzido por espécies reativas de oxigênio [2]. Ao contrário dos órgãos internos que não visivelmente perceptíveis a idade, o envelhecimento cutâneo tem grande importância social [2].

Dentre os fatores externos que aceleram o processo do envelhecimento estão os fatores ambientais, também chamados de expossomas, principalmente: radiações solares (ultravioleta, luz visível e infravermelho), poluição do ar, tabagismo, má nutrição e uso inadequado de produtos cosméticos [3]. Esses expossomas produzem espécies reativas de oxigênio, que danificam os telômeros, enzimas e membranas celulares do DNA [2].

A epiderme é um tecido que se autorrenova ao longo de toda a vida. As células são capazes de dividirem-se apenas por um número restrito de vezes, antes de sofrerem a parada permanente da divisão celular que durará até a morte [4]. A desaceleração da renovação epidérmica e do ciclo celular resulta numa barreira cutânea menos efetiva [1].

Os fibroblastos dérmicos são altamente proliferativos durante o desenvolvimento embrionário, pelo contrário, na

pele adulta são normalmente células quiescentes [4].

Na derme, alterações na estrutura da fibrilina, bem como a ação de metaloproteinases (MMP's) e outras proteases, geram uma diminuição do conteúdo de colágeno, contribuindo para a formação de rugas. Soma-se o fato de que na matriz extracelular da pele envelhecida as glicosaminoglicanas podem estar associados a material elástico anormal, funcionando de forma ineficaz, além da diminuição acentuada do ácido hialurônico [1].

Com base nos usos tradicionais e no conhecimento etnobotânico, os seres humanos têm usado recursos naturais empiricamente para cuidar da pele e modificar sua aparência física. Contudo, nos últimos anos, o interesse tornou-se mais amplo, e agora existe grande demanda por moléculas vegetais eficazes [2].

Os óleos essenciais são uma mistura de compostos voláteis altamente complexos sintetizados pelas plantas como metabólitos secundários. O óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) apresenta elevado potencial antioxidante, aumentando o nível de enzimas antioxidantes do sistema imunológico, incluindo superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase, além de diminuir a peroxidação de lipídios. Sendo assim, um excelente sequestrador de radicais livres [5].

Rosmarinus officinalis, conhecido como alecrim, é rico

em flavonóides, polifenóis, carnosol e diterpenóides, entre outros. Ativos com capacidade de diminuir a inflamação, aumentar a hidratação e a elasticidade da pele, além de uma forte atividade antioxidante e protetora contra a radiação ultravioleta [6]. Já a melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) é um óleo essencial conhecido pelas suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e pró-cicatrização de feridas [7].

Assim, objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos óleos essenciais de lavanda (*Lavandula angustifolia*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre a proliferação celular, a expressão de MMP's e síntese de colágeno total e ácido hialurônico, além da atividade de colagenase em fibroblastos dérmicos humanos.

MATERIAL E MÉTODO

Reagentes

Meio Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM), soro fetal bovino (SFB), antibióticos (penicilina-estreptomicina) e tampão fosfato (PBS) foram adquiridos da Gibco BRL (Grand Island, CA, USA). O reagente 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., USA).

Óleos essenciais de Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*)

Os óleos essenciais de *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis* e *Melaleuca alternifolia*, foram gentilmente cedidos pela Tisserand Aromatherapy (UK). A pureza e qualidade dos óleos essenciais foram monitorados pelo departamento de controle de qualidade da Tisserand Aromatherapy.

Linhagem celular e tratamento

Os fibroblastos da linhagem CCD-1072Sk foram cultivados em meio ISCOVE'S com 10% de soro fetal bovino, 0,292 g/L de L-glutamina, 1,0 g/L de D-glicose, 2,2 g/L de NaHCO₃, 10.000UI de Penicilina e 0,060 g/L de Estreptomicina. Os fibroblastos foram mantidos em frascos de 25 cm² (1×10⁵ cells/mL) em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Em todos os experimentos as culturas de fibroblastos foram submetidas ao teste de viabilidade celular (incorporação do corante azul de

tripano), sendo que todos os experimentos descritos foram realizados quando a viabilidade celular apresentava-se igual ou superior a 95%. Os fibroblastos foram avaliados frente a diferentes concentrações dos óleos essenciais de lavanda, alecrim e melaleuca, a saber: 0,01, 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0µg/mL por um período de 24 horas. Grupos controles, formados por fibroblastos sem tratamento com os óleos essenciais, foram utilizados como comparativos para determinação do efeito proliferativo. Grupos controle positivo, formados por fibroblastos tratados com ácido ascórbico (vitamina C), foram utilizados para validação da metodologia e comparação com os óleos essenciais. Antes do início dos testes de proliferação, as células foram privadas de soro bovino fetal por 6h.

Avaliação da viabilidade/citotoxicidade

Após 24 horas de incubação pós tratamento, o volume do meio foi reduzido para 900 µL e adicionaram-se 100 µL de 0,5 mg/mL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) para cada poço. Os fibroblastos foram incubados com o substrato por 2 h a 37 °C em uma incubadora de CO₂. O meio contendo substrato foi removido no final da incubação e 1 mL de DMSO foi adicionado por poço para dissolver os cristais de formazan. As placas foram agitadas em um agitador orbital por 30 min a temperatura ambiente. As absorvâncias foram medidas no FlexStation® 3 multimode Benchtop Reader (Molecular Devices, CA, USA) em 540 nm. Ao final da avaliação, foram determinados os valores de IC₈₀, como os volumes que foram considerados para os testes seguintes.

Sirius Red – Quantificação de Colágeno Total

Os fibroblastos foram cultivados e tratados conforme valores de IC₅₀ e IC₈₀, previamente determinados. Após isso, o meio foi retirado e os poços foram lavados três vezes com PBS 0,1M. Foi adicionado 100 µL de Fluido de Bouin (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético glacial) para fixação durante 1h. As amostras foram lavadas com PBS, em seguida, adicionado o corante Sirius Red. Após o tempo de 1h, foi removido o máximo do corante, e procedeu-se lavagem com 150 µL de solução de HCl 0,01M por 30 segundos para remoção do corante que não se ligou ao colágeno. Em seguida, o corante foi retirado das camadas celulares com adição de solução de NaOH 0,1M durante 30 minutos. Aliquotas de 100 µL das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA) a 570 nm.

Avaliação da síntese de ácido hialurônico (AH)

O efeito dos óleos essenciais na síntese de AH foi determinado usando um kit ELISA conforme orientação do fabricante. Os fibroblastos ($5,0 \times 10^4$ células/poço) foram cultivados em placas de 24 poços por 24 h a 37°C , 5% de CO_2 e tratados com os volumes representativos dos IC_{50} e IC_{80} , previamente estabelecidos, por 48h. Por fim, o sobrenadante da cultura foi coletado e a síntese de AH foi medida por ELISA. A absorbância foi medida a 450 e 570 nm usando um leitor de microplacas. A concentração de AH no sobrenadante cultivado foi adquirido a partir das células de fibroblastos tratadas, calculadas e comparadas com a curva padrão de AH.

Atividade de Collagenase

A atividade de collagenase foi avaliada por método de ELISA (ABCAM, USA), seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, os fibroblastos ($5,0 \times 10^4$ células/poço) foram tratados com os volumes representativos dos IC_{50} e IC_{80} , incubadas em placas de 96 poços, por 24h a 37°C , com 5% de CO_2 , em meio livre de soro fetal bovino. Os valores das absorbâncias foram obtidos com o auxílio de um leitor de microplacas.

Dosagem de metaloproteinases (MMP-1, MMP2 e MMP9)

O sobrenadante das culturas de fibroblastos tratados com os volumes representativos dos IC_{50} e IC_{80} , foi centrifugado a 12.000 g, por 15 min e a 4°C . Os kits MMP2 ELISA (RAB0365; Sigma, EUA) e os kits MMP9 ELISA (RAB0372; Sigma, Nanjing, China) foram utilizados para quantificar os níveis de secreção das enzimas MMP2 e MMP9. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Para detectar os níveis de MMP-1 nos sobrenadantes, o ensaio de ELISA foi realizado com um kit disponível no mercado (Abcam). As concentrações de MMP-1 foram detectadas de acordo com as instruções do fabricante.

Análises estatísticas

Todos os resultados foram representados como as médias \pm DP dos resultados de todas as repetições e a significância estatística foi determinado pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido de teste a posteriori de Tukey. Valores de probabilidade de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas

as análises foram realizadas usando o *Software GraphPad Prism* (versão 5.1).

RESULTADOS

Viabilidade celular e determinação do IC_{80}

A viabilidade dos fibroblastos foi determinada pela incorporação do corante vital azul de tripano. Os volumes de óleos essenciais e os percentuais de viabilidade estão representados na **figura 1**. Após realização do teste, a concentração escolhida para continuação do trabalho foi de $1\mu\text{g}/\text{mL}$.

O teste de viabilidade celular que utiliza a incorporação do corante vital azul de tripano, indicou que os óleos essenciais de alecrim, lavanda e melaleuca não reduziram a viabilidade celular dos fibroblastos CCD1072Sk, indicando, ao contrário, um efeito proliferativo, quando comparado às células sem tratamento (controle). Contudo, a proliferação induzida pelos óleos essenciais observada pelo teste de incorporação do azul de tripano não foi superior a taxa de proliferação observada no controle positivo, o ácido ascórbico (vitamina C).

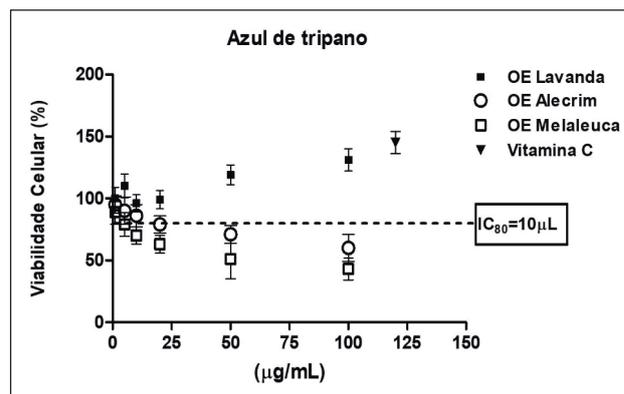


Figura 1. Viabilidade da linhagem celular CCD1072Sk (fibroblastos humanos), frente à diferentes volumes dos óleos essenciais de lavanda, alecrim e melaleuca. Resultados obtidos pelo ensaio de incorporação do corante azul de tripano, após exposição por 24 horas. Antes do início do teste, as células foram privadas de soro bovino fetal. Vitamina C foi utilizada como controle positivo. Testes realizados em triplicata. GraphPad Prism v5.0

Síntese de colágeno e ácido hialurônico

Em seguida, foi avaliada a influência de cada óleo essencial nas sínteses de colágeno total e ácido hialurônico pelos fibroblastos utilizados neste trabalho. Assim, a **figura 2** mostra os resultados obtidos para os óleos essenciais de lavanda ($1\mu\text{g}/\text{mL}$), alecrim ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) e melaleuca ($1\mu\text{g}/$

mL). Apenas o óleo essencial de lavanda foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) o teor de colágeno total, ao passo que, na síntese de ácido hialurônico, tanto o

óleo essencial de lavanda, como o óleo essencial de alecrim, aumentou significativamente ($p < 0,05$) o teor de ácido hialurônico.

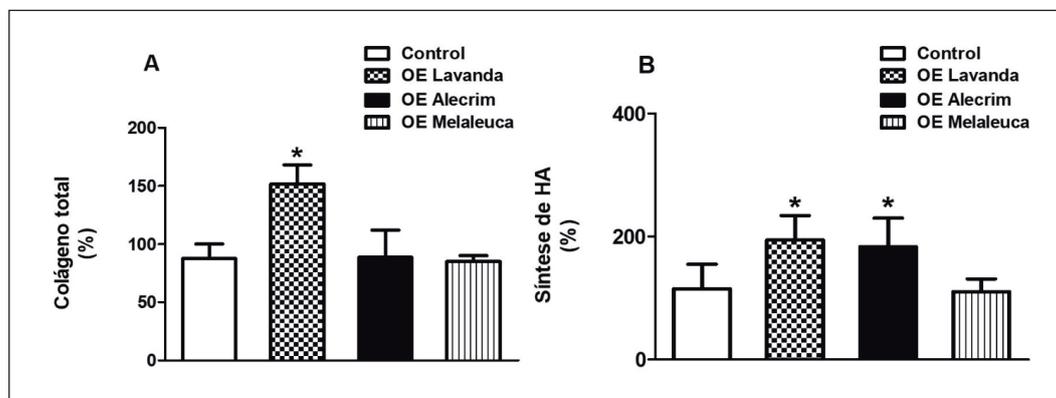


Figura 2. Efeitos dos óleos essenciais de lavanda, alecrim e melaleuca na síntese de colágeno total e ácido hialurônico. (A) A síntese de colágeno total, determinado pelo ensaio de corante ácido Sirius red. As células foram pré-incubadas em meio isento de soro por 24 horas e foram posteriormente tratadas com os óleos essenciais ($1\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. As células foram coradas com o corante Sirius Red e a absorbância foi determinada usando um leitor de microplacas a 570 nm. (B) A síntese de ácido hialurônico foi determinada por meio de kit de ELISA. As células foram pré-incubadas em meio isento de soro por 24 horas e foram posteriormente tratadas com os óleos essenciais ($1\mu\text{g/mL}$) por 48 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado para o teste de ELISA e a absorbância foi medida em 450 e 570 nm usando um leitor de microplacas. Ensaios realizados em triplicata e as médias \pm desvios padrão são mostradas como * $p < 0,05$ em relação às células não tratadas. GraphPad Prism v5.0

A capacidade dos óleos essenciais de lavanda, alecrim e melaleuca em reduzir a atividade da enzima collagenase (MMP-1), foi investigada. A **figura 3** mostra a redução significativa ($p < 0,05$) obtida com os óleos essenciais de lavanda e alecrim, ao passo que o óleo essencial de melaleuca, apenas indicou tendência de redução, mas sem significado estatístico.

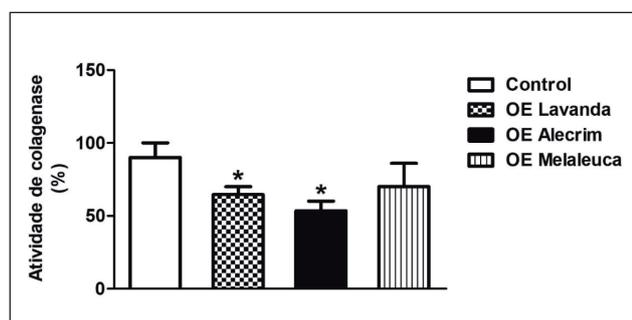


Figure 3. Atividade da enzima collagenase. A atividade da enzima collagenase foi determinada por ensaio colorimétrico. As células foram pré-incubadas em meio isento de soro por 24 horas e foram posteriormente tratadas com tratadas com os óleos essenciais ($1\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. O sobrenadante das culturas forma coletados

e a absorbância foi medida a 345 nm usando um leitor de microplacas. Ensaios realizados em triplicata e as médias \pm desvios padrão são mostradas como * $p < 0,05$ versus controle (células não tratadas). GraphPad Prism v5.0

Ao final, avaliamos a influência dos óleos essenciais de lavanda, alecrim e melaleuca na secreção das enzimas metaloproteinases MMP-1 (colagenase intersticial), MMP-2 e MMP-9 nos sobrenadantes das culturas de fibroblastos. Os resultados mostraram que os óleos essenciais de lavanda e alecrim reduziram significativamente ($p < 0,05$) a secreção de MMP-1, MMP-2 e MMP-9. Em relação ao óleo essencial de melaleuca, embora seja observada uma tendência de redução da secreção das MMP-1 e MMP-2, apenas a MMP-9 teve seus níveis reduzidos com significado estatístico ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO / CONCLUSÃO

O processo de envelhecimento cutâneo é desencadeado por fatores intrínsecos e extrínsecos, sendo o primeiro causado por alterações na elasticidade da pele ao longo do tempo, ao passo que, o segundo, é predominantemente resultado da exposição à radiação solar. Assim, a exposição

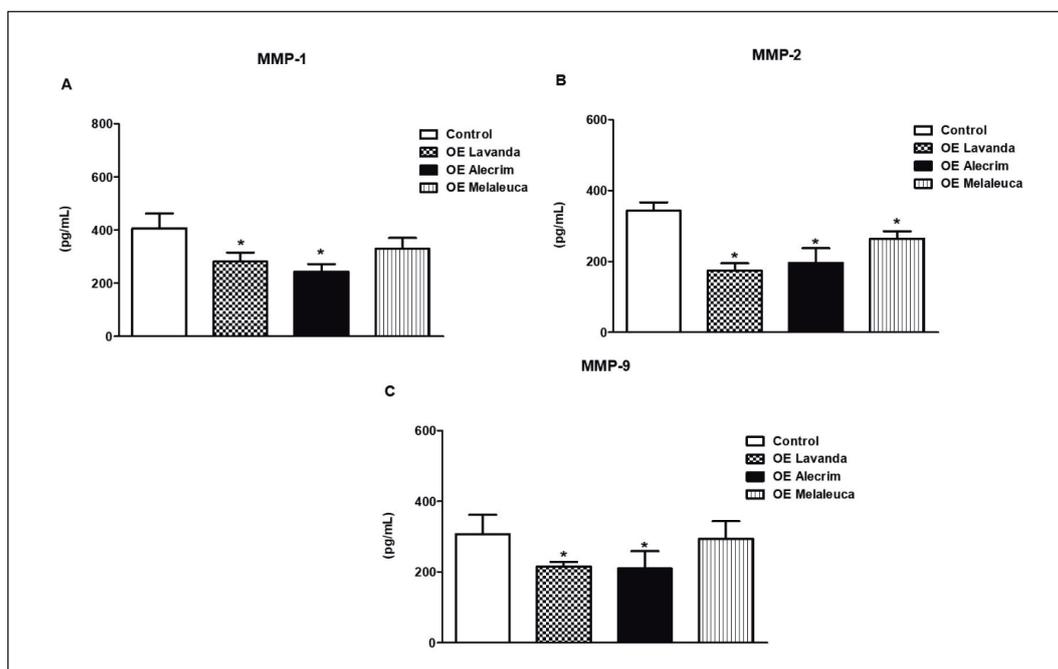


Figura 4. Secreção de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 na linhagem de fibroblastos CCD1072Sk. As células foram tratadas com 1µg/mL de cada um dos óleos essenciais por 24 horas. O ensaio de ELISA foi realizado para determinar os níveis de MMP-1 (A), MMP-2 (B) e MMP-9 (C) no sobrenadante das culturas celulares. Ensaio realizado em triplicata e as médias \pm desvios padrão são mostradas como * $p < 0,05$ versus as células não tratadas. GraphPad Prism v5.0.

aos raios ultravioleta provoca alterações físicas na pele devido a alterações que ocorrem no tecido conjuntivo por meio da formação de peróxidos lipídicos, conteúdo celular e enzimas [8].

Os óleos essenciais podem ser encontrados em diferentes partes dos vegetais (flores, folhas, cascas, madeiras, raízes, rizomas, frutas e sementes) e apresentam em sua composição, fenilpropanóides e, em especial, terpenos, moléculas portadoras de atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias [9,10]

A espécie *Rosmarinus officinalis* L. possui ações antioxidante e anti-inflamatória, devido, principalmente, a presença de terpenóides, flavonóides e polifenóis, incluindo ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico e ácido ursólico [6,11].

A *Lavandula angustifolia* produz um óleo essencial rico em compostos como o linalol e acetato de linalila, sendo responsáveis, pelo menos em parte, por efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, antioxidantes, antibacterianos e antifúngicos [5,12].

Melaleuca alternifolia, conhecida como melaleuca, apresenta alta capacidade antifúngica, bacteriostática e atividade germicida devido aos componentes como terpinen-4-ol, α -terpineol, linalol, α -pineno, β -pineno,

β mirreno e 1,8-cineol, além de alta atividade antioxidante relacionada com os seus compostos bioativos α -terpineno, α terpinoleno e γ -terpineno [7,13,14].

A modulação positiva na síntese de ácido hialurônico, obtida em nosso trabalho, após o tratamento das células com os diferentes óleos essenciais, bem como a mudança nos padrões de expressão e secreção de metaloproteases (MMP-1, MMP-2 e MMP-9), sugerem possível mecanismo inibitório da inflamação e do remodelamento tecidual, indicando propriedades anti-inflamatórias e anti-idade, além de proliferação celular envolvidas na cura de feridas [15,16].

Além disso, nossos resultados corroboram os achados da literatura, como aqueles obtidos por Chae et al., onde ficou demonstrado que o alecrim promoveu redução na produção de MMP-9 em células de músculo liso vascular, entretanto os autores não acharam inibição de MMP-2 [11].

Assim, embora estudos adicionais sejam necessários para entendermos os mecanismos envolvidos nas diferentes ações observadas neste estudo por parte dos diferentes óleos essenciais aqui estudados, os resultados confirmam o seu potencial cosmético/dermatológico, sugerindo que, num futuro próximo, possam figurar em formulações dermocosméticas.

Nossos resultados mostraram redução nos níveis de RNA mensageiros das MMPs avaliadas no trabalho, além de aumentar a proliferação de fibroblastos e estimular a síntese de colágeno e de ácido hialurônico. Desta forma, ainda que mais estudos sejam necessários, sugerimos que os óleos essenciais de alecrim e lavanda possam ser utilizados em formulações cosméticas destinadas à prevenção do envelhecimento cutâneo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa Tisserand pela gentil doação dos óleos essenciais avaliados neste trabalho.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- [1] MOHIUDDIN, A. K. **Skin Aging & Modern Edge Anti-Aging Strategies IJDSC**: July-2019: Page No: 08-62.
- [2] GONZÁLEZ-MINERO, F. J.; BRAVO-DÍAZ, L. **Review the Use of Plants in Skin-Care Products, Cosmetics and Fragrances: Past and Present**. *Cosmetics* 2018, 5, 50
- [3] KRUTMANN, J., BOULOC, A., SORE, G., BERNARD, B. A., & PASSERON, T. (2017). **The skin aging exposome**. *Journal of Dermatological Science*, 85(3), 152–161.
- [4] STRNADOVA, K. SANDERA, V.; DVORANKOVA, B.; KODET, O.; DUSKOVA, M.; SMETANA, K.; LACINA, L. **Skin aging: the dermal perspective**. *Clinics in Dermatology* (2019) 37, 326–335
- [5] AYAZ, M.; SADIQ, A.; JUNAID, M.; ULLAH, F.; SUBHAN, F.; AHMED, J. **Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants Front**. *Aging Neurosci.*, 30 May 2017.
- [6] MACEDO, L. M.; DOS SANTOS, E. M.; MILITÃO, L.; TUNDISI, L. L.; ATAIDE, J. A.; SOUTO, E. B.; MAZZOLA, P. G. **Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and Its Topical Applications: A Review**. *Plants* 2020, 9(5), 651.
- [7] HAN, X.; PARKER, T. L. **Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) essential oil demonstrates tissue-remodeling and metabolism-modulating activities in human skin cells**. *Journal Cogent Biology*. Volume 3, 2017 - Issue 1
- [8] THRING TS, HILI P, NAUGHTON DP. **Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants**. *BMC Complement Altern Med*. 2009; 9:27. Published 2009 Aug 4. doi:10.1186/1472-6882-9-27
- [9] AUMEERUDDY-ELALFI, Z.; LALL, N.; FIBRICH, B.; VAN STADEN, A. B.; HOSENALLY, M.; MAHOMOODALLY, M. F. **Selected essential oils inhibit key physiological enzymes and possess intracellular and Q1 extracellular antimelanogenic properties in vitro**. *JFDA*, 20 April 2017, v. 3, n. 12;
- [10] KOMEH-NKRUMAH SA, NANJUNDAIAH SM, RAJIAH R, YU H, MOUDGIL KD. **Topical dermal application of essential oils attenuates the severity of adjuvant arthritis in Lewis rats**. *Phytother Res*. 2012;26(1):54-59. doi:10.1002/ptr.3509
- [11] CHAE, G.; YU, M. H.; IM, N.; JUNG, I. T.; LEE, J.; CHUN, K.; LEE, I. **Effect of *Rosmarinus officinalis* L. on MMP-9, MCP-1 Levels, and Cell Migration in RAW 264.7 and Smooth Muscle Cells**. *J Med Food* 15 (10) 2012, 879–886.
- [12] KAZEMIA, M.; MOHAMMADIFARA, M.; AGHADAVOUDA, E.; VAKILIB, Z.; AARABIC, M. H.; TALAEID, S. A. **Deep skin wound healing potential of lavender essential oil and licorice extract in a nanoemulsion form: Biochemical, histopathological and gene expression evidences**. *Journal of Tissue Viability*, 2020.
- [13] PUVAČA, N.; ČABARKAPA, I.; PETROVIĆ, A.; BURSIC, V.; PRODANOVIĆ, R.; SOLEŠA, D.; LEVIĆ, J. **Tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and its essential oil: antimicrobial, antioxidant and acaricidal effects in poultry production**. *World's Poultry Science Journal*. 2019; 75.
- [14] GAROZZO, A.; TIMPANARO, R.; BISIGNANO, B.; FURNERI, P.M.; BISIGNANO, G.; CASTRO, A. **In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil**. *Lett. Appl. Microbiol*. 2009, 49, 806–808.
- [15] HAN X, BEAUMONT C, STEVENS N. **Chemical composition analysis and in vitro biological activities of ten essential oils in human skin cells**. *Biochim Open*. 2017; 5:1-7. Published 2017 Apr 26. doi: 10.1016/j.biopen.2017.04.001
- [16] TANDARA AA, MUSTOE TA. **MMP- and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts--impact of coculture and hydration**. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64(1):108-116. doi: 10.1016/j.bjps.2010.03.051)