

Topical application of a gel formulation containing Centauri® honey enhances epidermal water balance in healthy skin – data from a 28-day pilot trial

A aplicação tópica de uma formulação gel contendo mel Centauri® melhora o equilíbrio da água epidérmica na pele saudável - dados de um ensaio-piloto de 28 dias

Mariana Cariano Lopes^{1,2}, Patrícia Rijo¹ , & Luis Monteiro Rodrigues¹  

Keywords: Centauri® honey, skin physiology, epidermal hydration, barrier function, healthy skin

Palavras-chave: Mel Centauri®, fisiologia da pele, hidratação epidérmica, função de barreira, pele saudável

To Cite:

Lopes, M.C., Rijo, P., Monteiro Rodrigues, L. (2024) Topical application of a gel formulation containing Centauri® honey enhances epidermal water balance in healthy skin – data from a 28-day pilot trial. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 21(1), 43-55.

 [10.19277/bbr.21.1.346](https://doi.org/10.19277/bbr.21.1.346)

1 - CBIOS (Research Center for Biosciences and Health Technologies), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

2 - Curso Avançado de Medicina Estética Universidade Lusófona-SPMEC (4ª Edição)

Correspondence to / Correspondência a: monteiro.rodrigues@ulusofona.pt

Received / Recebido: 30/11/2024

Accepted / Aceite: 31/12/2024

Abstract

Honey is one of the oldest natural products applied to human skin. However, science-based evidence of some of its biological impacts are recent. Our study focuses on the impact of topically applied honey on healthy skin. To that purpose, a 28-day exploratory study was designed involving eight healthy participants of both sexes, selected following previously defined criteria. This double-blind study involved two identical formulations, where only one contained 5% (w/v) of a previously characterized honey (Centauri® honey, produced in Turkey). Formulations were applied daily (0.1 mL per application) for twenty-eight days (D0–D28) of regular use. Compliance was regularly verified by the investigators. Measured outcomes were “epidermal” barrier quantified by evaporimetry and epidermal hydration measured by electrometric techniques. Results demonstrated that at the end of the study period, the formulation with honey significantly reduced trans-epidermal water loss while improving both superficial and deep hydration of the skin as compared to the respective controls at D0. Similar favorable results were also obtained with the same formulation after a challenge test using tape-stripping. These results confirm the interest of this ingredient in skin health, even in healthy participants, that should be further explored.

Resumo

O mel é um dos mais antigos produtos naturais aplicados na pele humana. No entanto, as provas científicas de alguns dos seus impactos biológicos são recentes. O nosso estudo incide sobre o impacto do mel aplicado topicamente numa pele saudável. Para o efeito, foi concebido um estudo exploratório de 28 dias que envolveu oito participantes saudáveis de ambos os sexos, selecionados de acordo com critérios previamente definidos. Este estudo duplamente cego envolveu duas formulações idênticas, sendo que apenas uma continha 5% (p/v) de um mel previamente caracterizado (mel Centauri® Turquia). As formulações foram aplicadas diariamente (0,1 ml por aplicação) durante vinte e oito dias (D0-D28) de utilização regular. A conformidade foi verificada regularmente pelos investigadores. Os resultados medidos foram a barreira "epidérmica" quantificada por evaporimetria e a hidratação epidérmica medida por técnicas electrométricas. Os resultados demonstraram que, no final do período de estudo, a formulação com mel reduziu significativamente a perda de água transepidérmica e melhorou a hidratação superficial e profunda da pele, em comparação com os respectivos controlos no D0. Resultados favoráveis semelhantes também foram obtidos com a mesma formulação após um teste de stress usando fita adesiva. Estes resultados confirmam o interesse deste ingrediente na saúde da pele, mesmo em participantes saudáveis, aspecto que deve ser mais explorado.

Introduction

Natural products have been used as healing agents for thousands of years in human history, progressively selected by traditional medicine and ethno-pharmacology to improve their applicability regarding its capacity and specificities. Currently, natural products represent the most important source of new therapeutic molecules with potential interest for human needs (1-3).

The skin has been a major target for this development specially during the last two centuries (1,4). Recent reviews have shown evidence of specific properties such as wound healing, anti-inflammatory, and anti-allergic for many molecules of natural origin (1-4). However, science-based evidence to support many of the allegations attributed to the natural products by traditional medicine and ethno-pharmacology is limited.

Honey is likely one of the oldest natural products used by man as a nutrient, but also as an ingredient and vehicle in multiple therapeutic applications (5). It is considered a nutritious and healthy food, although its chemical composition greatly depends on its botanical and geographical origin. Honey is mainly composed of a mixture of different sugars, water and proteins, but it also contains enzymes, organic acids, vitamins, minerals and phenolic compounds in smaller quantities which contribute to its sensorial and functional characteristics (6). Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and healing properties have been linked to the use of honey, which has contributed to the increased interest in this nutrient as food (6).

Honey has been known for its skin healing capacities for more than 4000 years. It has been recommended to treat wounds, partial thickness burn wounds in particular, however, its effectiveness in the treatment of non-burn acute wounds and chronic wounds burns as other skin conditions is still conflicting (5,7-9). A few recent Cochrane reviews underscored these findings (9,10). Several honey-based products have been approved for medical use and are currently available on the market with different indications, which give us an idea of the relevance and utility of honey in wound healing (5,11).

Introdução

Os produtos naturais têm sido utilizados há milhares de anos na história da humanidade, como agentes curativos, progressivamente selecionados pela medicina tradicional e pela etnofarmacologia para melhorar a sua aplicabilidade no que diz respeito às suas capacidades e especificidades. Atualmente, os produtos naturais representam a fonte mais importante de novas moléculas terapêuticas com potencial interesse para utilização humana (1-3).

A pele tem sido um dos principais alvos deste desenvolvimento, especialmente durante os últimos dois séculos (1,4). Revisões recentes mostraram provas de propriedades específicas, como a cicatrização de feridas, propriedades anti-inflamatórias e anti-alérgicas para muitas moléculas de origem natural (1-4). No entanto, as provas científicas que sustentam muitas das alegações atribuídas a produtos naturais pela medicina tradicional e pela etnofarmacologia são limitadas.

O mel é provavelmente um dos produtos naturais mais antigos utilizados pelo homem como nutriente, mas também como ingrediente e veículo em múltiplas aplicações terapêuticas (5). É considerado um alimento nutritivo e saudável, embora a sua composição química dependa muito da sua origem botânica e geográfica. O mel é composto principalmente por uma mistura de diferentes açúcares, água e proteínas, mas também contém enzimas, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais e compostos fenólicos em quantidades menores que contribuem para as suas características sensoriais e funcionais (6). As propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e cicatrizantes associadas à utilização do mel, tem contribuído para o aumento do interesse por este nutriente como alimento (6).

O mel é conhecido pelas suas capacidades de cicatrização da pele há mais de 4000 anos. Tem sido recomendado para o tratamento de feridas, em particular de queimaduras de espessura parcial. No entanto, a sua eficácia no tratamento de outras feridas agudas e de feridas crônicas, bem como de outras afecções cutâneas, continua a ser contraditória (5,7-9). Algumas revisões Cochrane recentes sublinharam estas conclusões (9,10). Vários produtos à base de mel foram aprovados para utilização médica e estão atualmente disponíveis no mercado com diferentes indicações, o que nos dá uma ideia da relevância e utilidade do mel na cicatrização de feridas (5,11).

The physicochemical nature of honey makes it an ideal wound dressing, capable of hydrating injured tissues while fighting microbial infections and reducing inflammation. Much of the literature on the healing properties of honey has focused its antiseptic effects. A few reviews have shown consistent evidence of moisturizing, antimicrobial, nourishing and pH-regulating properties in topically applied honey in vivo (5,9,10,12,15,16), which confirms its particular interest in terms of skin care. Other in vitro studies demonstrated that honey can promote angiogenesis, granulation and epithelialization, stimulating lymphocytes and phagocytes, inducing the expression of molecular markers of tissue repair and triggering the epithelial-mesenchymal transition in keratinocytes (5,7,9,13,16,17). Honey-induced wound repair has been attributed to the activation of cell proliferation regulatory pathways, leading to the re-epithelialization of keratinocytes (11,14,17). Manuka honey was recently referred to decrease eosinophilic activation, improve erythema, edema and excoriation in patients with atopic dermatitis (5,7,9,15) but many other varieties and origins have been disclosed.

The interesting properties traditionally associated with honey, especially regarding its skin repair capacities, indicate that honey has an enormous potential for application in aesthetic and cosmetic medicine. However, there is still some lack of objective evidence to support many of these allegations. The biological potential of Centauri® honey, a well-known product produced in Turkey, has been recently characterized (18) and facilitated our approach on the impact of topical application of a gel containing honey on human skin in healthy participants. With this study we expect to expand scientific knowledge regarding the effects of honey on skin repair while promoting evidence-based research in the field of aesthetic and cosmetic medicine.

Material and Methods

Honey

A commercially available sample of Centauri® Honey, produced from remote alpine regions in Turkey, was used for this study. The honey is produced by bees that inhabit isolated caves with access to special endemic flowers year-round, promoting a unique

A natureza físico-química do mel torna-o um penso ideal para feridas, capaz de hidratar os tecidos lesionados, ao mesmo tempo que combate as infecções microbianas e reduz a inflamação. Grande parte da literatura sobre as propriedades curativas do mel tem-se centrado nos seus efeitos anti-sépticos. Algumas revisões mostraram evidências consistentes de propriedades hidratantes, antimicrobianas, nutritivas e reguladoras de pH no mel topicamente aplicado in vivo (5,9,10,12,15,16), o que confirma o seu interesse em termos de cuidados com a pele. Outros estudos in vitro demonstraram que o mel pode promover a angiogénese, a granulação e a epitelização, estimulando os linfócitos e os fagócitos, induzindo a expressão de marcadores moleculares de reparação dos tecidos e desencadeando a transição epitelial-mesenchimal nos queratinócitos (5,7,9,13,16,17). A reparação de feridas induzida pelo mel tem sido atribuída à ativação de vias reguladoras da proliferação celular, levando à reepitelização dos queratinócitos (11,14,17). O mel de Manuka foi recentemente referido como diminuindo a ativação eosinofílica, melhorando o eritema, o edema e a escoriação em doentes com dermatite atópica (5,7,9,15), mas muitas outras variedades e origens foram divulgadas.

As propriedades interessantes tradicionalmente associadas ao mel, especialmente no que respeita às suas capacidades de reparação da pele, indicam que o mel tem um enorme potencial de aplicação na medicina estética e cosmética. No entanto, há ainda alguma falta de demonstração objectiva que suporte muitas destas alegações. O potencial biológico do mel Centauri®, um conhecido produto produzido na Turquia, foi recentemente caracterizado (18) e facilitou a nossa abordagem sobre o impacto da aplicação tópica de um gel contendo mel na pele humana em participantes saudáveis. Com este estudo, esperamos alargar o conhecimento científico sobre os efeitos do mel na fisiologia da pele, promovendo simultaneamente a investigação baseada em provas no domínio da medicina estética e cosmética.

Material e métodos

Mel

Para este estudo, foi utilizada uma amostra comercialmente disponível do mel Centauri®, produzido em regiões alpinas remotas da Turquia. O mel é produzido por abelhas que habitam grutas

product already characterized in terms of quality, physicochemical properties, nutritional parameters and biological potential (18).

Formulation

The base formulation (excipient) chosen was a gel, involving honey, glycerin (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal), disodium ethylene-diamine-tetra-acetate (Saninter, Lisbon, Portugal) and a paraben preservative solution based on methylparaben (6% w/w, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) and propylparaben (3% w/w, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) in propylene glycol (LABCHEM, Santo Antão do Tojal, Portugal). The polymer (Carbopol® 940, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) was diluted in distilled water and left to hydrate and expand before adding the previously prepared mixture. Triethanolamine (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) was added under stirring until obtaining a viscous and homogeneous gel with a pH value of 4.6 ± 0.1 . The honey concentration in the formulation was 5%. A control gel was likewise prepared without the addition of honey.

Participants

The study was conducted on a sample of healthy participants of both sexes ($n=8$, 5 women and 3 men, mean age 42.26 ± 11.5 years) recruited at our university center. Preliminary selection requirements applied to all participants were (i) being over 18 years old (ii) absence of any health problem, including skin lesions at application sites and (iii) no history of any specific response to topical products.

All experimental procedures, previously evaluated by the institutional Ethics Committee, respected the principles of good clinical practice established in the Declaration of Helsinki and its subsequent amendments (19) and included a written informed consent obtained from all participants.

Protocol

The safety profile of the formulation was previously confirmed by our research group using a modified open patch test version involving a single application and monitoring to detect any skin reaction within 48 hours of application (20).

isoladas com acesso a flores endêmicas especiais durante todo o ano, promovendo um produto único já caracterizado em termos de qualidade, propriedades físico-químicas, parâmetros nutricionais e potencial biológico (18).

Formulação

A formulação base (excipiente) escolhida foi um gel, envolvendo mel, glicerina (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal), etileno-diamina-tetra-acetato dissódico (Saninter, Lisboa, Portugal) e uma solução conservante de parabens à base de metilparabeno (6% p/p, AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemanha) e propilparabeno (3% p/p, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) em propilenoglicol (LABCHEM, Santo Antão do Tojal, Portugal). O polímero (Carbopol® 940, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) foi diluído em água destilada e deixado a hidratar e expandir antes de adicionar a mistura previamente preparada. Adicionou-se trietanolamina (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) sob agitação até se obter um gel viscoso e homogêneo com um valor de pH de $4,6 \pm 0,1$. A concentração de mel na formulação foi de 5%. Foi igualmente preparado um gel de controlo sem a adição de mel.

Participantes

O estudo foi realizado numa amostra de participantes saudáveis de ambos os sexos ($n=8$, 5 mulheres e 3 homens, idade média de $42,26 \pm 11,5$ anos) recrutados no nosso centro universitário. Os requisitos de seleção preliminares aplicados a todos os participantes foram (i) ter mais de 18 anos de idade, (ii) ausência de qualquer problema de saúde, incluindo lesões cutâneas nos locais de aplicação e (iii) ausência de história de qualquer resposta específica a produtos tópicos.

Todos os procedimentos experimentais, previamente avaliados pelo Comité de Ética institucional, respeitaram os princípios de boas práticas clínicas estabelecidos na Declaração de Helsínquia e suas alterações subsequentes (19) e incluíram um consentimento informado por escrito obtido de todos os participantes.

Protocolo

O perfil de segurança da formulação foi previamente confirmado pelo nosso grupo de investigação, utilizando uma versão modificada de teste de adesivo aberto, envolvendo uma única aplicação e monitorização para detetar qualquer reação cutânea nas 48 horas seguintes à aplicação (20).

After inclusion, participants were asked not to apply any cosmetics or any other topical products to the test areas 48 hours before the start of the study (D0) and on the last day of intervention (D28). The study was designed for 28 days (D0–D28) with daily applications of 0.1 mL, with a syringe, with two coded formulations - one with the gel vehicle, and the other with the gel vehicle with 5% (w/v) honey

Three areas (3 cm²) were drawn on each participant's forearm and application sites were chosen randomly for each participant using the Latin square procedure. Empty site 1 corresponded to the negative control, site 2 to the gel vehicle and site 3 to the bioactive corresponding to the gel vehicle with 5% honey (Figure 1).

The first application took place in the laboratory with the investigator (PI), who explained all the steps and illustrated the procedure of the topical application of each formulation. Each volunteer also received a simplified graphic representation of the topical application sequence to be followed once a day at home. The PI regularly confirmed participant compliance by telephone. During the study period, participants were instructed not to apply detergents, emollients, moisturizers or any cosmetics to the tested sites on both forearms.

Após a inclusão, foi pedido aos participantes que não aplicassem quaisquer cosméticos ou outros produtos tópicos nas áreas de teste 48 horas antes do início do estudo (D0) e no último dia de intervenção (D28). O estudo foi concebido para 28 dias (D0-D28) com aplicações diárias de 0,1 ml, com uma seringa, com duas formulações codificadas - uma com o veículo gel, e a outra com o gel adicionado de 5% (p/v) de mel

Foram desenhadas três áreas (3 cm²) no antebraço de cada participante e os locais de aplicação foram escolhidos aleatoriamente para cada participante utilizando o procedimento do quadrado latino. O local vazio 1 correspondia ao controlo negativo, o local 2 ao veículo gel e o local 3 ao bioativo correspondente ao veículo gel com 5% de mel (Figura 1).

A primeira aplicação teve lugar no laboratório com o investigador principal (IP), que explicou todos os passos e ilustrou o procedimento de aplicação tópica de cada formulação. Cada voluntário recebeu também uma representação gráfica simplificada da sequência de aplicação tópica a seguir uma vez por dia. O IP confirmava regularmente, por telefone, a adesão dos participantes. Durante o período do estudo, os participantes foram instruídos a não aplicar detergentes, emolientes, hidratantes ou quaisquer cosméticos nos locais testados em ambos os antebraços.

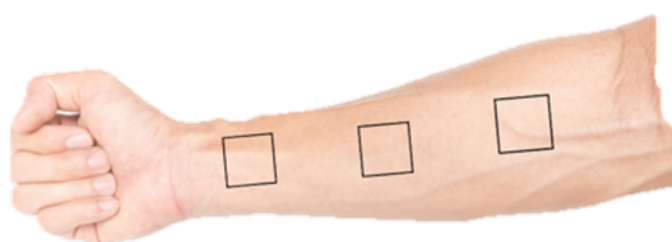


Figure 1 - Graphical representation of the study design. The sites were marked on the arm and the formulations (see text) in a random sequence using the Latin square. The application at site 1 was left empty to match the negative control. Measurements occurred at each site before and after completing the intervention protocol. After the last day's measurements, a biopsy of the skin surface was performed by tape stripping and physiological variables were measured immediately after the procedure (see text).

Figura 1 - Representação gráfica do desenho do estudo. Os locais foram marcados no braço e as formulações (ver texto) numa sequência aleatória utilizando o quadrado latino. A aplicação no local 1 foi deixada em branco para corresponder ao controlo negativo. As medições foram efectuadas em cada local antes e depois da conclusão do protocolo de intervenção. Após as medições do último dia, foi efectuada uma biópsia da superfície da pele através de uma fita adesiva e as variáveis fisiológicas foram medidas imediatamente após o procedimento (ver texto).

Skin physiology was characterized by non-invasive technologies. All measurements took place in the same laboratory under controlled conditions (relative humidity 50+ 2% and temperature 22 ± 2 °C) and were obtained by the same operator. Measurements took place on the day of inclusion (D0) and after 28 days of starting intervention with both formulations (D28).

The variables considered most important to represent skin physiology were the following:

- Transepidermal water loss (TEWL), the most important indicator of the epidermal barrier (21) using the Tewameter TM300® (CK Electronics, Cologne, Germany) (22),
- Epidermal, superficial and deep hydration using MoistureMeterSC (Delfin Technologies, Finland), and MoistureMeterD (Delfin Technologies, Kuopio, Finland) respectively; these systems are based on the assessment of epidermal capacitance and are widely applied for these purposes (23).

In order to identify a potential protective effect associated with the regular use of the formulations under study, a tape stripping stress test was conducted two days after the end of the 28-day intervention (D30). This approach uses standard adhesive tape to stick-to-peel the skin repeatedly (30 times) at all tested sites (23,24). This procedure is easy to perform and does not cause discomfort to the patient, providing a controlled in-depth assessment of in vivo epidermis. Measurements of TEWL and epidermal hydration capacitance (as above) were made before and after the stress test.

Statistical Analysis

Data are presented as mean values \pm standard deviation (SD) from three independent replicates ($n = 3$). A Kolmogorov-Smirnov test was performed to assess normality. For statistical comparisons, we applied one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures to detect differences between various groups, followed by Tukey's post hoc test to identify specific differences between groups. All statistical analyzes were performed using Jamovi® (version 2.2, The Jamovi Project, Sydney, Australia) and GraphPad® Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

The significance level was set at $p < 0.05$.

A fisiologia da pele foi caracterizada por tecnologias não invasivas. Todas as medições tiveram lugar no mesmo laboratório em condições controladas (humidade relativa 50+ 2% e temperatura 22 ± 2 °C) e foram obtidas pelo mesmo operador. As medições foram efectuadas no dia da inclusão (D0) e após 28 dias do início da intervenção com ambas as formulações (D28).

As variáveis consideradas mais importantes para representar a fisiologia da pele foram as seguintes

- Perda de água transepidérmica (TEWL), o indicador mais importante da barreira epidérmica (21), utilizando o Tewameter TM300® (CK Electronics, Colónia, Alemanha) (22),
- Hidratação epidérmica, superficial e profunda utilizando, respetivamente, o MoistureMeterSC (Delfin Technologies, Finlândia) e o MoistureMeterD (Delfin Technologies, Kuopio, Finlândia); estes sistemas baseiam-se na avaliação da capacitância epidérmica e são amplamente utilizados para estes fins (23);

A fim de identificar um potencial efeito protetor associado à utilização regular das formulações em estudo, foi realizado um teste de stress com fita adesiva dois dias após o final da intervenção de 28 dias (D30). Esta abordagem utiliza uma fita adesiva padrão para aderir á superfície da pele e ser removida de seguida, de forma repetida (30 vezes) em todos os locais testados (23,24). Este procedimento é fácil de executar e não causa desconforto ao doente, proporcionando uma exploração controlada e aprofundada da epiderme in vivo. As medições da TEWL e da hidratação epidérmica foram efectuadas antes e depois do teste de esforço.

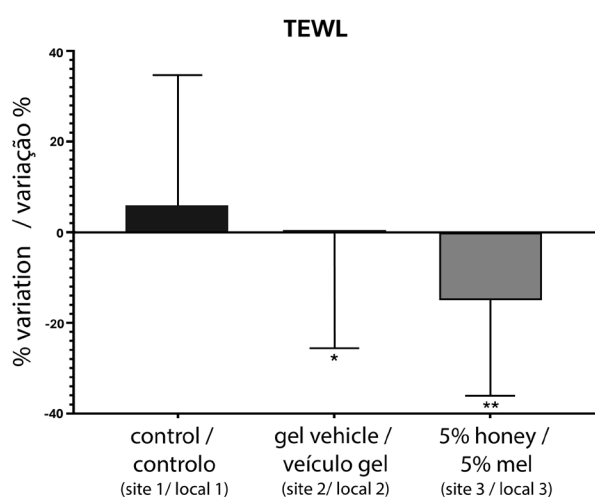
Análise estatística

Os dados são apresentados como valores médios \pm desvio padrão (DP) de três réplicas independentes ($n = 3$). Foi efectuado um teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade. Para comparações estatísticas, aplicámos uma análise de variância de uma via (ANOVA) para medidas repetidas para detetar diferenças entre vários grupos, seguida do teste post hoc de Tukey para identificar diferenças específicas entre grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com Jamovi® (versão 2.2, The Jamovi Project, Sydney, Austrália) e GraphPad® Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

Results

After twenty-eight days of regular (daily) use of the formulations under study, we observed clear evidence of the impact of this intervention on the dynamics of epidermal water balance. Figure 2 shows the differences between day 0 and day 28 of the TEWL, a primary indicator of epidermal barrier function. Although no difference was detected for site 1, corresponding to the empty site, significant decreases in TEWL were observed in all participants at sites 2 and 3 ($p < 0.05$ and $p < 0.005$ respectively), being particularly marked at site 3, corresponding to the honey formulation.



Resultados

Após vinte e oito dias de utilização regular (diária) das formulações em estudo, observámos evidências claras do impacto desta intervenção na dinâmica do balanço hídrico epidérmico. A Figura 2 mostra as diferenças entre o dia 0 e o dia 28 da TEWL, um indicador primário da função de barreira epidérmica. Embora não tenha sido detectada qualquer diferença para o local 1, correspondente ao local vazio, foram observadas diminuições significativas na TEWL em todos os participantes nos locais 2 e 3 ($p < 0,05$ e $p < 0,005$, respetivamente), sendo particularmente acentuadas no local 3, correspondente à formulação de mel.

Figure 2 - Differences in TEWL observed between day 0 and after 28 days of topical application of these study formulations (see text). As shown, the differences are pronounced at the site corresponding to the honey formulation (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$).

Figura 2 - Diferenças na TEWL observadas entre o dia 0 e após 28 dias de aplicação tópica das formulações estudadas (ver texto). Como se pode ver, as diferenças são mais acentuadas no local correspondente à formulação com mel (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$).

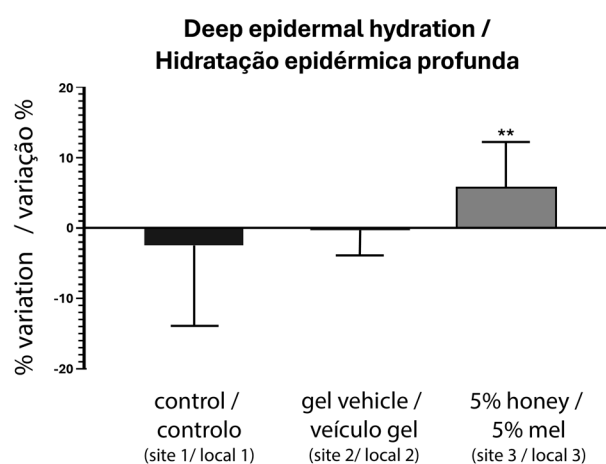
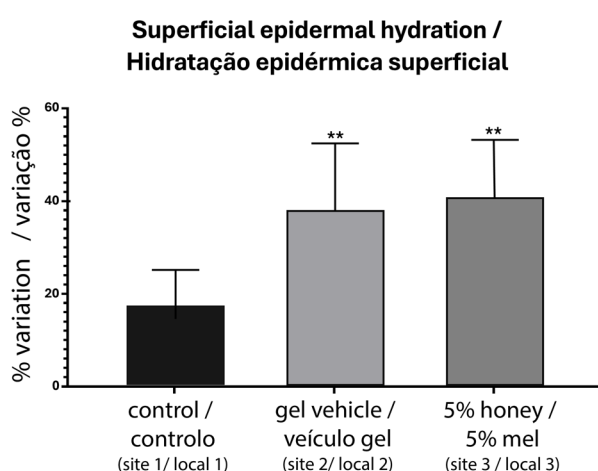


Figure 3 - Differences in superficial and deep hydration measured by the electrometric method (capacitance) recorded between day 0 and after 28 days of topical application of the formulations under study (see text). As demonstrated in both cases, the differences are clearly pronounced in the site corresponding to the formulation with honey (** $p < 0.005$).

Figura 3 - Diferenças de hidratação superficial e profunda medidas pelo método eletrométrico (capacitância) registadas entre o dia 0 e após 28 dias de aplicação tópica das formulações em estudo (ver texto). Como demonstrado em ambos os casos, as diferenças são claramente acentuadas no local correspondente à formulação com mel (** $p < 0,005$).

In line with these observations, epidermal hydration showed the same evolution. Similar significant differences between day 0 and day 28 were found for both formulations ($p < 0.005$), while no differences were detected at the negative control site (Figure 3). However, only the areas treated with the honey formulation showed very significant differences in terms of deep hydration of the epidermis (Figure 3).

We also tested the impact of these formulations on skin water dynamics by applying a tape-stripping stress test also known as skin surface biopsy - to the treated sites. This procedure has long been used to collect samples of the epidermis, primarily with

De acordo com estas observações, a hidratação epidérmica registou a mesma evolução. Foram encontradas diferenças significativas semelhantes entre o dia 0 e o dia 28 para ambas as formulações ($p < 0,005$), não tendo sido detectadas diferenças no local do controlo negativo (Figura 3). No entanto, apenas as zonas tratadas com a formulação de mel apresentaram diferenças muito significativas em termos de hidratação profunda da epiderme (Figura 3).

Também testámos o impacto destas formulações na dinâmica da água da pele, aplicando um teste de stress com fita adesiva - também conhecido como biopsia da superfície da pele - nos locais tratados. Este procedimento tem sido utilizado há muito tempo

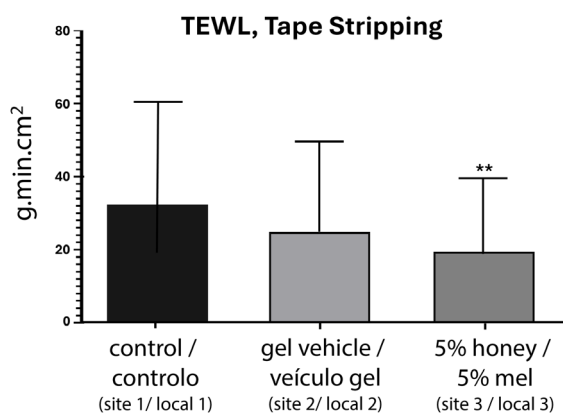


Figure 4 - TEWL measurement at D30 at each tested site after stripping with tape (see text). As demonstrated, the site treated with the 5% honey formulation presents lower TEWL values, likely related to a potential effect on epidermal cohesion. (** $p < 0.005$).

Figura 4 - Medição da TEWL em D30 em cada local testado após a remoção com fita adesiva (ver texto). Como demonstrado, o local tratado com a formulação de mel a 5% apresenta valores mais baixos de TEWL, provavelmente relacionados com um potencial efeito na coesão epidérmica. (** $p < 0.005$).

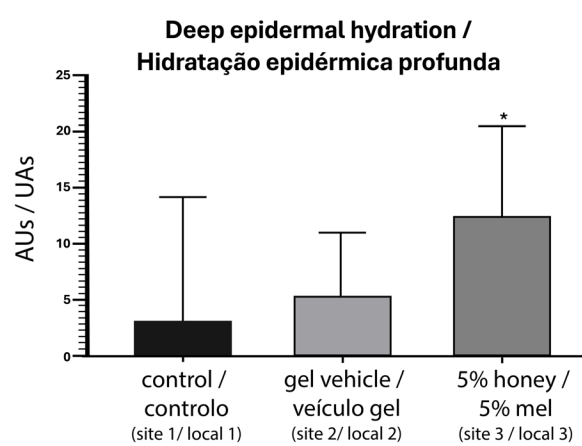
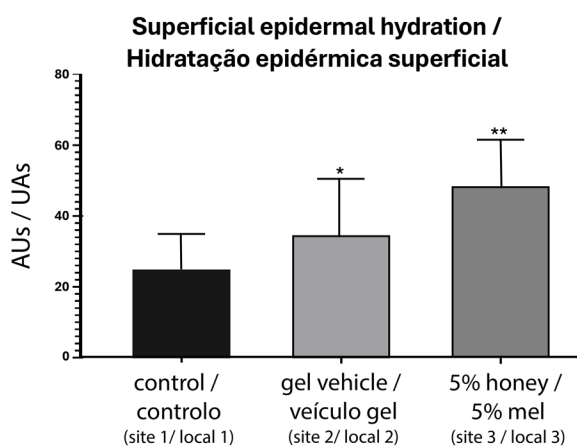


Figure 5 - Differences in surface and deep hydration measured at D30 by the electrometric method (capacitance) after stripping with adhesive tape. As demonstrated in both cases, the differences are clearly pronounced in the site corresponding to the formulation with honey (* $p < 0.05$; ** $p > 0.005$)

Figura 5 - Diferenças de hidratação superficial e profunda medidas em D30 pelo método eletrométrico (capacitância) após decapagem com fita adesiva. Como demonstrado em ambos os casos, as diferenças são claramente acentuadas no local correspondente à formulação com mel (* $p < 0,05$; ** $p > 0,005$)

diagnostic purposes; however, its experimental potential has been recently indicated for other applications, including research (24,25). It was recently demonstrated that a 30x repeated stripping procedure removes no more than 30% of the epidermal layer (24). After removal (Figure 4), both the empty site and the site treated with the formulation vehicle showed high TEWL values that were similar between the sites and not significantly different from the TEWL values obtained before stripping. However, the TEWL values obtained at the site treated with the honey formulation (site 3) were significantly lower ($p < 0.005$) than at sites 1 and 2 (Figure 4).

In line with these results, data from the compared epidermal hydration capacitance analysis after stripping in all sites confirmed that this site treated with the 5% honey formulation showed significantly higher levels of both superficial and deep hydration. (Figure 5).

Discussion

The objective of this study was to evaluate the impact resulting from the application of honey as a natural bioactive in a gel formulation on healthy human skin for twenty-eight days. The formulation's primary safety was previously confirmed (20).

After twenty-eight days of regular (daily) use of the formulations under study, we observed a significant decrease in TEWL where formulations were applied (sites 2 and 3) (Figure 2). However, this reduction was particularly noted in the site corresponding to the formulation with honey ($p < 0.005$). No differences were detected at the empty site (no formulation, site 1).

Regarding hydration, the regular application of both formulations significantly increased epidermal surface hydration ($p < 0.005$) compared to D0, in contrast to the negative control. However, the site treated with the honey formulation also showed a significant increase in deep hydration ($p < 0.005$), distinct from the other two sites (Figure 3).

Although we cannot explain the mechanisms behind these apparently related findings, the high sugar content allowing the formation of hydrogen bonds with water may explain the increase in water in the more superficial epidermis (6,8,12). As we noticed,

para recolher amostras da epiderme, principalmente para fins de diagnóstico; no entanto, o seu potencial experimental foi recentemente indicado para outras aplicações, incluindo a investigação (24,25). Foi recentemente demonstrado que um procedimento de stripping repetido 30x não remove mais de 30% da camada epidérmica (24). Após a remoção (Figura 4), tanto o local vazio como o local tratado com o veículo da formulação apresentaram valores elevados de TEWL que eram semelhantes entre os locais e não significativamente diferentes dos valores de TEWL obtidos antes da remoção. No entanto, os valores de TEWL obtidos no local tratado com a formulação de mel (local 3) foram significativamente menores ($p < 0,005$) do que nos locais 1 e 2 (Figura 4).

Em conformidade com estes resultados, os dados da análise da capacidade de hidratação epidérmica comparada após a decapagem em todos os locais confirmaram que este local tratado com a formulação de mel a 5% apresentava níveis significativamente mais elevados de hidratação superficial e profunda. (Figura 5).

Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto resultante da aplicação do mel como bioativo natural numa formulação em gel na pele humana saudável durante vinte e oito dias. A segurança primária da formulação foi previamente confirmada (20).

Após vinte e oito dias de uso regular (diário) das formulações em estudo, observou-se uma diminuição significativa da TEWL nos locais onde as formulações foram aplicadas (locais 2 e 3) (Figura 2). No entanto, esta diminuição foi particularmente notada no local correspondente à formulação com mel ($p < 0,005$). Não foram detectadas diferenças no local vazio (sem formulação, local 1).

Em relação à hidratação, a aplicação regular de ambas as formulações aumentou significativamente a hidratação da superfície epidérmica ($p < 0,005$) em comparação com o D0, em contraste com o controlo negativo. No entanto, o local tratado com a formulação de mel também apresentou um aumento significativo na hidratação profunda ($p < 0,005$), diferente dos outros dois locais (Figura 3).

Embora não possamos explicar os mecanismos por detrás destes resultados aparentemente relacionados, o elevado teor de açúcar que permite a formação de ligações de hidrogénio com a água pode explicar o aumento de água na epiderme mais superficial

the hydration increase reaches the deeper epidermis. More water in the intercellular spaces, potentially caused by the high osmotic pressure of honey sugars, reinforces the hydrolipidic mantle and facilitates the diffusion of other elements (proline, gluconic acid, for example) through the membranes as it penetrates deeper into the skin (7,9, 14,26-29). However, these effects seem to reveal an unexpected increase in the reinforcement of epidermal cohesion and/or vitality. Although these cannot be exclusively attributed to honey, as they are also observed only with the vehicle (gel-free formulation), to the effects are increased in the presence of honey. The reinforcement of epidermal hydration, mainly attributable to sugars and osmosis, would lead us to expect an increase in TEWL due to the evaporation of free water on the surface of the skin. However, not only does TEWL decrease, but there is also an increase in hydration in the deeper layers of the epidermis (Figure 3), which brings us to the cell proliferation and skin re-epithelialization properties that are still poorly understood but have long been attributed to honey (14,15,26-29).

The stripping test is a very moderate controlled experimental approach to a tissue under stress. It aims to mimic a compromised epidermis, with the purpose of observing whether the impact of applying the honey formulation to the skin surface still involves some protective effect. Recalling the data previously reported on the very significant reduction in TEWL in the treated areas, especially regarding the honey gel, and the increase in superficial and deep hydration of the epidermis in all treated areas, we observed that the honey formulation site after tape stripping presented significantly higher hydration levels than the remaining sites, including the vehicle without honey (Figure 5). Regarding superficial hydration, the site treated with the vehicle still showed significantly higher hydration than the negative control, but only the site treated with the honey formulation showed deep hydration significantly different from the others (Figure 5). These data corroborate the above observations, since the controlled removal of a portion of the stratum corneum not only reduces the amount of water retained in the most superficial epidermis but also facilitates the measurement of deeper water which, as we have seen, was significantly increased with the formulation with honey.

(6,8,12). Como observamos, o aumento da hidratação atinge a epiderme mais profunda. A presença de mais água nos espaços intercelulares, potencialmente causada pela elevada pressão osmótica dos açúcares do mel, reforça o manto hidrolipídico e facilita a difusão de outros elementos (prolina, ácido glucônico, por exemplo) através das membranas à medida que se penetra mais profundamente na pele (7,9, 14,26-29). No entanto, estes efeitos parecem revelar um aumento inesperado do reforço da coesão epidérmica e/ou da sua vitalidade. Embora estes efeitos não possam ser atribuídos exclusivamente ao mel, uma vez que são igualmente observados apenas com o veículo (formulação sem gel), os seus efeitos são reforçados na presença do mel. O reforço da hidratação epidérmica, principalmente atribuível aos açúcares e à osmose, levar-nos-ia a esperar um aumento da TEWL devido à evaporação da água livre na superfície da pele. No entanto, não só a TEWL diminui, como também se regista um aumento da hidratação nas camadas mais profundas da epiderme (Figura 3), o que nos leva às propriedades de proliferação celular e de reepitelização da pele, ainda mal compreendidas, mas há muito atribuídas ao mel (14,15,26-29).

O teste de stripping é uma abordagem experimental controlada e muito moderada de um tecido sob stress. Tem como objetivo mimetizar uma epiderme comprometida, afim de observar se o impacto da aplicação na superfície da pele da formulação com mel ainda envolve algum efeito protetor. Relembrando os dados anteriormente reportados sobre a redução muito significativa da TEWL nas áreas tratadas, especialmente no que diz respeito ao gel com mel, e o aumento da hidratação superficial e profunda da epiderme em todas as áreas tratadas, observamos que o local da formulação com mel apresentou após stripping níveis de hidratação significativamente mais elevados do que os restantes locais, incluindo o veículo sem mel (Figura 5). Em relação à hidratação superficial, o local tratado com o veículo ainda apresentou hidratação significativamente maior que o controle negativo, mas apenas o local tratado com a formulação de mel apresentou hidratação profunda significativamente diferente dos demais (Figura 5). Estes dados corroboram as observações anteriores, uma vez que a remoção controlada de uma porção do estrato córneo não só reduz a quantidade de água retida na epiderme mais superficial como também facilita a medição da água mais profunda que, como vimos, foi significativamente aumentada com a formulação com mel.

To the best of our knowledge, these findings are original as this effect of reinforcing epidermal water dynamics in vivo, producing a high water content environment with reduced TEWL directly impacting the deepest epidermal layers, has not been previously described. In our opinion, this effect seems to be attributable to honey and its impact on epidermal cohesion, and therefore to be related to the strengthening of the epidermal barrier, even in healthy individuals. More data is necessary to experimentally confirm these claims.

The small number of participants is admittedly an objective limitation of our study, although it was exploratory by design. Our choice of a single type of honey for this trial was also deliberate, based on the results of a previous study (18). However, this is one of the first studies evaluating the impact of a topical formulation with honey carried out in healthy humans to test its physiological impact, revealing properties that appear more complex and promising than we assumed, even in healthy individuals. In any case, it is a data-driven scientific investigation of value and interest to be continued and expanded, also in disease, to increase our knowledge and capacity for intervention in aesthetic and cosmetic medicine.

Conclusion

The present work offers a new look into the mechanisms involved in the hydration capacities of topically applied formulations containing honey, recommending further studies in this direction.

Author contributions

M.C. performed the experimental investigation, analyzed data and wrote the manuscript; P.R. supplied the bioactive and related research; L.M.R. was responsible for the concept and design of the study, writing and revising the manuscript's final version. All authors approved the final submitted version.

Tanto quanto sabemos, estes resultados são originais, uma vez que este efeito de reforço da dinâmica da água epidérmica in vivo, produzindo um ambiente de elevado teor de água com uma TEWL reduzida com impacto direto nas camadas epidérmicas mais profundas, não foi descrito anteriormente. Na nossa opinião, este efeito parece ser atribuível ao mel e ao seu impacto na coesão epidérmica e, por conseguinte, estar relacionado com o reforço da barreira epidérmica, mesmo em indivíduos saudáveis. São necessários mais dados para confirmar experimentalmente estas afirmações.

O número reduzido de participantes é, sem dúvida, uma limitação objetiva do nosso estudo, embora se trate de um estudo exploratório. A escolha de um único tipo de mel para este estudo também foi deliberada, com base nos resultados de um estudo anterior (18). No entanto, este é um dos primeiros estudos de avaliação do impacto de uma formulação tópica com mel realizado em seres humanos saudáveis para testar o seu impacto fisiológico, revelando propriedades que parecem mais complexas e promissoras do que supúnhamos, mesmo em indivíduos saudáveis. Em todo o caso, trata-se de uma investigação de valor e interesse, baseada em dados, cientificamente validados, que deve ser continuada e alargada, também na doença, para aumentar o nosso conhecimento e capacidade de intervenção na medicina estética e cosmética.

Conclusão

O presente trabalho oferece um novo olhar sobre os mecanismos envolvidos nas capacidades de hidratação de formulações de aplicação tópica contendo mel, recomendando mais estudos nesta direção.

Contribuições dos autores

M.C. realizou a investigação experimental, analisou os dados e redigiu o manuscrito; P.R. forneceu o bioativo e investigação relacionada; L.M.R. foi responsável pela conceção e desenho do estudo, redação e revisão da versão final do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final submetida

Funding

The funding for this research was provided by national funds through the Foundation for Science and Technology, I.P. (Portugal), specifically under the projects with DOIs 10.54499/UIDP/04567/2020 and 10.54499/UIDB/04567/2020.

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to Sergio Andrade and to all participants in the study.

Conflict of interest

The editors involved in this manuscript's authorship had no participation in the review or decision process. All authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

Financiamento

O financiamento desta investigação foi assegurado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. (Portugal), nomeadamente no âmbito dos projectos com os DOIs 10.54499/UIDP/04567/2020 e 10.54499/UIDB/04567/2020.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar os seus agradecimentos a Sérgio Andrade e a todos os participantes no estudo.

Conflito de interesses

Os editores envolvidos na autoria deste manuscrito não tiveram qualquer participação no processo de revisão ou decisão. Todos os autores declararam que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. Bernardini, S., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V., & Ovidi, E. (2018). Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*, 32 (16),1926-1950. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1356838>
2. Cheng, Y. C., Li, T. S., Su, H. L., Lee, P. C., & Wang, H. M. D. (2020). Transdermal delivery systems of natural products applied to skin therapy and care. *Molecules*, 25(21), 5051. <https://doi.org/10.3390/molecules25215051>
3. Costa, E. F., Magalhães, W. v., & di Stasi, L. C. (2022). Recent Advances in Herbal-Derived Products with Skin Anti-Aging Properties and Cosmetic Applications. *Molecules*, 27(21), 7518. <https://doi.org/10.3390/molecules27217518>
4. Fernandes, A., Rodrigues, P. M., Pintado, M., & Tavaría, F. K. (2023). A systematic review of natural products for skin applications: Targeting inflammation, wound healing, and photo-aging. *Phytomedicine*, 115, 154824. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154824>
5. McLoone, P., Oluwadun, A., Warnock, M., & Fyfe, L. (2016). Honey: A Therapeutic Agent for Disorders of the Skin. *Central Asian Journal of Global Health*, 5(1), 241 <https://doi.org/10.5195/cajgh.2016.241>
6. Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Rzepecka-Stojko, A., Balwierz, R., & Stojko, J. (2020). Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 25(3), 556. <https://doi.org/10.3390/molecules25030556>
7. Jodidio, M., & Schwartz, R. A. (2024). Honey therapies for dermatological disorders: more than just a sweet elixir. *International Journal of Dermatology*, 63 (4), 422-430. <https://doi.org/10.1111/ijd.16925>
8. Palma-Morales, M., Huertas, J. R., & Rodríguez-Pérez, C. (2023). A Comprehensive Review of the Effect of Honey on Human Health. *Nutrients* 15(13), 3056. <https://doi.org/10.3390/nu15133056>
9. Jull, A. B., Cullum, N., Dumville, J. C., Westby, M. J., Deshpande, S., & Walker, N. (2015). Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015(3), CD005083. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005083.pub4>
10. Norman, G., Christie, J., Liu, Z., Westby, M. J., Jefferies, J. M., Hudson, T., Edwards, J., Mohapatra, D. P., Hassan, I. A., & Dumville, J. C. (2017). Antiseptics for burns. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2017, Issue 7). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011821.pub2>
11. Angioi, R., Morrin, A., & White, B. (2021). The rediscovery of honey for skin repair: Recent advances in mechanisms for honey-mediated wound healing and scaffolded application techniques. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(11), 5192. <https://doi.org/10.3390/app11115192>
12. Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 1259510. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
13. Burlando, B., & Cornara, L. (2013). Honey in dermatology and skin care: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306-313. <https://doi.org/10.1111/jocd.12058>
14. Ranzato, E., Martinotti, S., & Burlando, B. (2012). Epithelial mesenchymal transition traits in honey-driven keratinocyte wound healing: Comparison among different honeys. *Wound Repair and Regeneration*, 20(5), 778-785. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00825.x>
15. Alangari, A. A., Ashoori, M. D., Alwan, W., Dawe, H. R., Stockinger, B., Barker, J. N., Wincent, E., & di Meglio, P. (2023). Manuka honey activates the aryl hydrocarbon receptor: Implications for skin inflammation. *Pharmacological Research*, 194, 106848. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106848>
16. McLoone P., Oladejo T., Kassym L., McDougall G. (2024). Honey Phytochemicals: Bioactive Agents With Therapeutic Potential for Dermatological Disorders. *Phototherapy Research*, 38(12), 5741-5764. <https://doi.org/10.1002/ptr.8330>
17. Yilmaz, A. C., & Aygin, D. (2020). Honey Dressing In Wound Treatment: A Systematic Review. *Complementary Therapies in Medicine*, 51, 102388. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102388>
18. Filipe, M.C, Kowalczyk, T., Kukula-Koch W., et al. (2024). Evaluating the quality, physicochemical properties, and biological activities of Centauri® honey from Turkey. *Food Bioscience*, 62, 105028. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429224014585?via%3Dihub>
19. World Medical Association Declaration of Helsinki (2000). *International Journal of Pharmaceutical Medicine*, 14, 279–281. <https://doi.org/10.2165/00124363-200010000-00014>
20. Meloni, M., & Berardesca, E. (2001). The impact of COLIPA guidelines for assessment of skin compatibility on the development of cosmetic products. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2(2), 65-68 <https://doi.org/10.2165/00128071-200102020-00002>
21. Pinnagoda, J., Tupkek, R. A., Agner, T., & Serup, J. (1990). Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis*, 22(3), 164-178. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1990.tb01553.x>
22. Berardesca, E., Loden, M., Serup, J., Masson, P., & Rodrigues, L. M. (2018). The revised EEMCO guidance for the in vivo measurement of water in the skin. *Skin Research and Technology*, 24(3), 351-358. <https://doi.org/10.1111/srt.12599>
23. Mayrovitz, H. N., & Luis, M. (2010). Spatial variations in forearm skin tissue dielectric constant. *Skin Research and Technology*, 16(4), 438-43. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2010.00456.x>
24. Wang, H., Baran, U., & Wang, R. K. (2015). In vivo blood flow imaging of inflammatory human skin induced by tape stripping using optical microangiography. *Journal of Biophotonics*, 8(3), 265-272. <https://doi.org/10.1002/jbio.201400012>
25. Olesen, C. M., Fuchs, C. S. K., Philipsen, P. A., Hædersdal, M., Agner, T., & Clausen, M. L. (2019). Advancement through epidermis using tape stripping technique and Reflectance Confocal Microscopy. *Scientific Reports*, 9(1), 12217. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48698-w>
26. Wu, G. (2021). Amino Acids in Nutrition and Health. *Frontiers in Bioscience - Landmark* 26(12), 1386–1392. <https://doi.org/10.52586/5032>
27. Pageon, H., Azouaoui, A., Zucchi, H., Ricois, S., Tran, C., & Asselineau, D. (2019). Potentially beneficial effects of rhamnose on skin ageing: an in vitro and in vivo study. *International Journal of Cosmetic Science*, 41(3), 213-220. <https://doi.org/10.1111/ics.12523>
28. Al-Ghazzewi, F. H., & Tester, R. F. (2014). Impact of prebiotics and probiotics on skin health. *Beneficial Microbes*, 5(2), 99–107. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0040>
29. Gorouhi, F., & Maibach, H. I. (2009). Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International Journal of Cosmetic Science*, 31, 327–345. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00490.x>