

**Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações
dermocosméticas para o controle de alterações cutâneas
relacionadas ao fotoenvelhecimento**

Gabriela Maria D'Angelo Costa

**Ribeirão Preto
2023**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas
para o controle de alterações cutâneas relacionadas ao
fotoenvelhecimento**

GABRIELA MARIA D'ANGELO COSTA

Ribeirão Preto
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA MARIA D'ANGELO COSTA

**Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas
para o controle de alterações cutâneas relacionadas ao
fotoenvelhecimento**

Versão Corrigida

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 14/04/2023. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2023

RESUMO

D'ANGELO COSTA, G. M. **Desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas para o controle de alterações cutâneas relacionadas ao fotoenvelhecimento**. 2023. 170f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A pele fotoenvelhecida caracteriza-se pela presença de rugas, perda de elasticidade e alterações no padrão de pigmentação. A radiação ultravioleta provoca a formação de radicais livres, o que causa danos à pele e as alterações cutâneas características do fotoenvelhecimento. Dessa forma, as substâncias com potencial antioxidante são de grande valia para a prevenção e controle do fotoenvelhecimento. Dentre os antioxidantes de uso tópico o tetrakisopalmitato de ascorbila (TIPA), a *Spirulina* sp. e o extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol, são substâncias inovadoras para aplicação em produtos dermocosméticos para o controle de alterações cutâneas decorrentes do fotoenvelhecimento. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar a eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo antioxidantes, em combinação ou isolados para o controle de alterações cutâneas decorrentes do fotoenvelhecimento. Para tal, foram desenvolvidas formulações cosméticas à base de ingredientes de origem natural e fotoprotetores por meio de um delineamento experimental do tipo fatorial (DOE). As formulações cosméticas e fotoprotetoras desenvolvidas foram estáveis e apresentaram propriedades sensoriais e físico-mecânicas adequadas às finalidades propostas. Os fotoprotetores apresentaram Fator de Proteção Solar (FPS) acima de 30. A aplicação do DOE otimizou o desenvolvimento das formulações cosméticas e dos fotoprotetores. A eficácia clínica das formulações acrescidas dos antioxidantes em estudo isolados e em associação foi realizada por meio de técnicas de biofísica e análise de imagem da pele. As formulações contendo TIPA ou *Spirulina* sp. ou o extrato de oliva reduziram significativamente hiperpigmentações relacionadas ao lentigo solar e efélides após seis semanas de aplicação das formulações. Além disso, a formulação contendo o TIPA foi eficaz na melhora da qualidade do estrato córneo e do padrão de favo de mel da epiderme, aumentou a hidratação da epiderme viável e a densidade de colágeno. A formulação contendo a associação de *Spirulina* sp. e o extrato de oliva foi eficaz no aumento da hidratação, melhora da função barreira da pele e nas características morfológicas e estruturais da pele após o uso em 12 semanas. Em síntese, as formulações propostas foram estáveis e eficazes na proteção da pele contra os danos da radiação solar. Além disso, os antioxidantes avaliados foram eficazes na redução de hiperpigmentações e outras alterações cutâneas relacionadas ao fotoenvelhecimento, como ressecamento da pele e redução da densidade dérmica. Por fim, as formulações cosméticas desenvolvidas são inovadoras e eficazes para os cuidados da pele fotoenvelhecida com comprovação científica por meio de estudos clínicos com medidas instrumentais.

Palavras-chave: Formulações Cosméticas, *Spirulina* sp., Extrato de Oliva, Tetrakisopalmitato de Ascorbila, Eficácia Clínica, Microscopia Confocal de Reflectância

ABSTRACT

D'ANGELO COSTA, G. M. **Development and clinical efficacy of dermocosmetic formulations for the control of photoaging-related skin alterations.** 2023. 170f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Photoaging skin is characterized by the presence of wrinkles, loss of elasticity, and changes in the pigmentation pattern. Ultraviolet radiation causes the formation of free radicals, which causes skin damage and skin changes characteristic of photoaging. Thus, substances with antioxidant potential are of great value for the prevention and control of photoaging. Among the topical antioxidants, ascorbyl tetraisopalmitate (ATIP), *Spirulina* sp. and olive extract standardized in hydroxytyrosol are innovative substances for application in dermocosmetic products for the control of skin changes due to photoaging. In this context, the aim of the present study was to develop and evaluate the clinical efficacy of dermocosmetic formulations containing antioxidants, in association or isolated for the control of skin changes resulting from photoaging. For this purpose, cosmetic formulations based on ingredients of natural origin and sunscreens were developed by means of a design of experiments (DOE). The developed cosmetic and sunscreens formulations were stable and presented adequate sensorial and physical-mechanical properties for the proposed purposes. The sunscreens presented Sun Protection Factor (SPF) above 30. The application of DOE optimized the development of cosmetic formulations and sunscreens. The clinical efficacy of the formulations added with the study antioxidants isolated and in association was performed by means of biophysical techniques and skin imaging analysis. The formulations containing ATIP or *Spirulina* sp. or the olive extract significantly reduced hyperpigmentations related solar lentigo and ephelides after six weeks of application of the formulations. In addition, the formulation containing ATIP was effective in improving the quality of the *stratum corneum* and honeycomb pattern of the epidermis, increased the hydration of the viable epidermis and the collagen density. The formulation containing the association of *Spirulina* sp. and olive extract was effective in increasing hydration, improving the skin barrier function and the morphological and structural characteristics of the skin after 12 weeks of use. In summary, the proposed formulations were stable and effective in protecting the skin from solar radiation damage. Furthermore, the antioxidants evaluated were effective in reducing skin hyperpigmentation and other photoaging-related skin changes, such as skin dryness and reduced dermal density. Finally, the cosmetic formulations developed are innovative and effective for the care of photoaging skin with scientific proof through clinical studies with instrumental measurements.

Keywords: Cosmetic formulations, *Spirulina* sp., Olive extract, Ascorbil tetraisopalmitate, Reflectance Confocal Microscopic.

1. INTRODUÇÃO

O mercado global de produtos cosméticos de anti-envelhecimento atingiu cerca de 63 bilhões de dólares em 2021 e está projetado para atingir 93 bilhões de dólares até 2027 (Statista, 2023). Este mercado é impulsionado, devido ao crescimento da população mundial idosa e a procura por ter uma aparência jovem e saudável.

Durante o século XXI, é notado que a população mundial envelhece em maior quantidade com o passar dos anos. Isso ocorre devido à diminuição da taxa de natalidade e o aumento da longevidade. Por exemplo, 727 milhões foi o número da população acima de 65 anos no mundo em 2020 (United Nations, 2020). Estima-se que em 2050 esta população dobre de novo e alcance por volta de 1,5 bilhões de idosos (United Nations, 2020).

Os primeiros sinais do envelhecimento biológico são mostrados na pele e o envelhecimento cutâneo está associado à fatores intrínsecos e extrínsecos (Kammeyer; Luiten, 2015).

A radiação Ultravioleta (UV) é um dos fatores extrínsecos que mais causam o envelhecimento cutâneo e é denominado como fotoenvelhecimento. A radiação UV é dividida em três categorias: UVA (320–400nm), UVB (290–320nm) e UVC (200–290nm). A radiação UVC é a mais nociva para a pele, porém é barrada na camada de ozônio. A radiação UVB atinge a pele até a epiderme e causa dano direto no DNA, com a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina e fotoprodutos de pirimidina (6-4) pirimidona. A radiação menos energética é a UVA, conseguindo atingir camadas mais profundas (derme) e causa dano indireto no DNA, lipídeos e proteínas por meio da geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (Kammeyer; Luiten, 2015; Tobin, 2017).

O fotoenvelhecimento está relacionado a um envelhecimento cutâneo precoce. A exposição solar prolongada e sem proteção em indivíduos com fototipos de Fitzpatrick de I a III pode provocar alterações na aparência cutânea, como: palidez, textura áspera, diminuição da elasticidade, telangiectasia e presença de alterações pigmentares. Um fotoenvelhecimento mais severo pode resultar em rugas profundas, aparência coriácea, púrpura actínica, espessamento da epiderme e derme (Han; Chien; Kang, 2014).

O estresse oxidativo causado pela incidência da radiação UV na pele pode levar a melanogênese fotoinduzida. Os EROS ativam a transcrição do gene da tirosinase que sintetiza a enzima tirosinase, a qual é ativada por glicosilação e converte tirosina em DOPA e DOPAquinona até a formação da melanina. A melanina é então empacotada em melanossomas e transportada para os queratinócitos. O aumento da melanogênese fotoinduzida e do transporte de melanossomas dos melanócitos para os queratinócitos resultam no aparecimento de alterações pigmentares (Ortonne; Bissett, 2008; Gillbro; Olsson, 2011; Vashi; Kundu, 2013; Nahhas et al., 2019).

As alterações pigmentares que ocorrem no fotoenvelhecimento geralmente são: lentigo solar e as efélides. O lentigo solar é uma hiperpigmentação cutânea que ocorre igualmente em homens e mulheres de meia idade ou terceira idade que possuem fotoenvelhecimento cutâneo. Os pontos marrons escuros da pele, localizados em lugares frequentemente expostos ao sol, como: face, dorso das mãos, ombros e parte superior das costas, são características morfológicas do lentigo solar. O diâmetro é de 1-3 mm e na maioria das vezes são maiores na face com 1-2 cm (Massia, 1999; Iriyama et al., 2011).

Outra alteração pigmentar que pode ocorrer por meio do dano induzido pela radiação UV são as efélides, também conhecidas como sardas, que se localizam principalmente na face. A sua morfologia possui geralmente o diâmetro de 1-3 mm e pode ser de coloração marrom claro a escuro, podendo ficar pálidas durante o inverno (Ogden; Schofield, 2013).

Os antioxidantes são utilizados no tratamento das alterações cutâneas relacionadas ao fotoenvelhecimento, pois atuam diminuindo o estresse oxidativo da pele causado pela radiação UV (Burke, 2018). Ocorre a redução da formação de radicais livres e da fotooxidação da melanina. O uso dos antioxidantes para o controle das alterações pigmentares vêm sendo utilizada por atuarem na prevenção da melanogênese fotoinduzida (Ortonne; Bissett, 2008; Gillbro; Olsson, 2011; Vashi; Kundu, 2013; Nahhas et al., 2019).

O antioxidante mais utilizado para tratamento tópico sem prescrição médica é a vitamina C ou ácido ascórbico que promove a síntese de colágeno e inibe a tirosinase, enzima responsável pela síntese de melanina (melanogênese). Deste modo, a vitamina C é uma substância ativa multifuncional, atuando na prevenção do dano oxidativo no DNA e melhorando a aparência geral da pele com o clareamento cutâneo (Bradley et al., 2015).

A utilização da vitamina C em formulações cosméticas é considerada um desafio, por ter baixa estabilidade em água e facilidade de oxidação (Silva; Maia Campos, 2000; Maia Campos et al., 2012). Com isso, os derivados de vitamina C vêm sendo utilizados em função da sua maior estabilidade química em formulações cosméticas (Silva et al., 2019). O derivado lipossolúvel da vitamina C, o tetraisopalmitato de ascorbila (TIPA) é um bom precursor da vitamina C e possui capacidade de supressão da pigmentação induzida por UVB (Ochiai et al., 2006). Além disso, a penetração na pele do TIPA foi estudada por Machado e colaboradores (2016) e a mesma possuiu afinidade com o estrato córneo, o que sugere um uso tópico.

Estudos recentes avaliaram a eficácia clínica de formulações contendo tetraisopalmitato de ascorbila isolado no efeito anti-rugas (Yokota; Yahagi, 2022) e seu uso em associação com melatonina e bakuchiol na melhora da aparência da pele, textura da pele, pigmentação, eritema, tônus da pele, linhas e rugas após 12 semanas (Goldberg; Mraz-Robinson; Granger, 2020). Além disso, D'Angelo Costa e Maia Campos (2021), mostraram o efeito de formulações cosméticas contendo o derivado lipossolúvel de vitamina C na redução da hiperpigmentação cutânea.

Além da vitamina C e derivados, outros antioxidantes merecem destaque, como a *Spirulina* sp. e o hidroxitiroso, os quais também foram objeto de estudo desta tese.

A *Spirulina* sp. é uma microalga muito utilizada em alimentos, por ter uma grande variedade de micro e macronutrientes (Soni; Sudhakar; Rana, 2017). A composição da *Spirulina* sp. inclui 55%-70% de proteínas, 15%-20% de hidratos de carbono, 5%-8% de lípidos, 6%-8% de minerais (magnésio, manganês), 1,5%-2% de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), ácido linolênico, vitaminas B1, B2, B3, B6, B9, B12, vitaminas C e E, pigmentos como a zeaxantina e a cantaxantina, bem como enzimas (C-

ficocianina e aloficocianina) (Maddiboyina et al., 2023). O extrato seco da *Spirulina* sp. não é irritante para os olhos, porém apresenta potencial fototóxico (Maia Campos et al., 2019). A fototoxicidade de uma substância química pode estar relacionada com a fotosensibilidade frente a radiação UV (Epstein, 1999). Com isso, ela é indicada para uso tópico noturno. Possui aplicação em medicina para combater as deficiências nutricionais em países subdesenvolvidos (Soni; Sudhakar; Rana, 2017) e em cosméticos como um ingrediente ativo multifuncional (Delsin et al., 2015; Souza; Maia Campos, 2017; Melo et al., 2021). A sua utilização em cosméticos é patenteada pelo grupo de pesquisa, como antioxidante para prevenir os radicais livres que agem no fotoenvelhecimento, por suas propriedades de hidratação e melhora da aparência geral da pele (Maia Campos; Camargo Jr; Corauce, 2012).

Outras aplicações da *Spirulina* sp. foram avaliadas na presente tese de doutorado, como o seu uso em formulações inovadoras para a melhora do lentigo solar e efélides (D'Angelo Costa; Maia Campos, 2021). Além disso, foi avaliada a associação da *Spirulina* sp. com o extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol em uma formulação para o controle de alterações cutâneas relacionadas ao fotoenvelhecimento.

O hidroxitirosol é um importante composto fenólico presente no azeite de oliva (Robles-Almazan et al., 2018). Estudos comprovaram a sua ação como um potente antioxidante (Zhou; Sun; Shahidi, 2017; Sun; Zhoua; Shahidi, 2018). A utilização do extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol de forma oral e tópica para o controle do melasma foi estudado por Toledo Bagatin; Maia Campos; Bagatin, (2020). O referido extrato foi eficaz na redução de hiperpigmentações decorrentes do fotoenvelhecimento (D'Angelo Costa; Maia Campos, 2021).

Nesse contexto, o desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de formulações dermocosméticas contendo TIPA, *Spirulina* sp. e extrato de oliva, isolados ou associados, é de grande importância para o desenvolvimento de produtos cosméticos efetivos para o controle de alterações cutâneas relacionadas ao fotoenvelhecimento.

Considerando que o uso diário de fotoprotetores na face com Fator de Proteção Solar (FPS) 30, no mínimo, é fundamental para prevenir o fotoenvelhecimento (Krutmann, 2021), bem como previne o eritema causado pela radiação UV, danos no

DNA, hiperpigmentações e fotocarcinogênese (Guan; Lim; Mohammad, 2021), o desenvolvimento de fotoprotetores eficazes e seguros é de fundamental importância para os cuidados e proteção da pele.

Assim, no desenvolvimento de fotoprotetores é fundamental considerar uma combinação adequada de filtros solares orgânicos e inorgânicos que protegem a pele contra a radiação UVA e UVB de forma complementar (Forestier, 2008). Uma vez que os filtros solares orgânicos possuem cromóforos em sua estrutura molecular que permitem a absorção da radiação UV e os filtros solares inorgânicos refletem esta radiação por serem partículas físicas que têm o principal mecanismo de reflexão e difusão da luz solar (Forestier, 2008). A escolha dos filtros UV deve basear-se nas características de fotoestabilidade, segurança toxicológica ambiental e humana e sensoriais (Jesus et al., 2022). A obtenção do equilíbrio entre os filtros solares UV, aditivo reológico, emoliente, concentração e tipo de emulsionantes se faz necessária no desenvolvimento de protetores solares estáveis, eficazes e com um sensorial agradável.

O desenvolvimento de formulações cosméticas e fotoprotetoras pode ser otimizado por meio do delineamento experimental do tipo fatorial (DOE). O DOE é uma técnica utilizada na indústria para planejar experimentos com precisão estatística e com menor custo, a fim de obter resultados rápidos e confiáveis que substitui o desenvolvimento por “tentativa e erro”. Os passos para a execução do DOE são: definir o objetivo do teste, selecionar as variáveis – fatores e a resposta, escolher o teste estatístico adequado, executar o experimento, checar, analisar e interpretar os dados obtidos (Politis et al., 2017). Em síntese, o planejamento fatorial é uma ferramenta estatística utilizada para avaliar efeitos e interações de variáveis independentes (ingredientes) em relação a determinados parâmetros, com a finalidade de otimizar o desenvolvimento (Radocaj et al., 2011; Antony, 2014a).

No desenvolvimento de formulações cosméticas o balanço adequado entre aditivo reológico, emulsificante, emoliente e substâncias ativas também se faz necessário. Por isso, o DOE também pode ser aplicado durante o desenvolvimento de formulações

cosméticas contendo ingredientes de origem natural (Costa, Alves, Maia Campos, 2019).

O uso de ingredientes de origem natural em produtos cosméticos é uma tendência crescente, devido ao aumento de consumidores conscientes (Abihpec; Sebrae; 2019). Estima-se que o mercado de produtos orgânicos de cuidados pessoais alcance 42,19 bilhões até 2030 (Grand View Research, 2022a). A preocupação com a sustentabilidade é um movimento global crescente que visa diminuir o impacto do ser humano no ambiente (Fonseca-Santos, Corrêa, Chorilli, 2015). Para isso, algumas estratégias podem ser adotadas na indústria, como reduzir a energia consumida no processo de emulsificação (Fonseca-Santos, Corrêa, Chorilli, 2015). A emulsificação a frio é uma das vantagens de usar um emulsificante do tipo organogel. O organogel é um sistema semi-sólido, onde a fase oleosa está imobilizada por uma rede 3D do agente estruturante (Sahoo et al., 2011). Esta fase oleosa pode ser óleos vegetais ou minerais, ou solventes orgânicos polares. O agente estruturante pode ser constituído por ceras, monoglicéridos, polímeros ou éteres de polioliol (Sahoo et al., 2011). O organogel utilizado neste estudo possui o INCI name *Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil (and) Polyacrylic Acid (and) Xylityl Sesquicaprylate (and) Glyceryl Stearate (and) Euphorbia Cerifera (Candellila) Wax (and) Sodium Hydroxide*. O organogel atua como um emulsificante de emulsões óleo em água e estrutura a fase aquosa e oleosa (Contreras-Ramírez et al., 2022). Com isso, há um aumento da estabilidade da emulsão sem a necessidade de utilizar alta agitação e temperatura. O organogel suporta até 12% de fase oleosa, permite a redução de ingredientes da formulação, possui características viscoelásticas e termo-reversíveis, além de propriedades sensoriais refinadas (Nogueira et al., 2016). Estas características do organogel são interessantes, uma vez que o uso de ingredientes de origem natural pode ser desafiador, devido a instabilidade, sensorial e desempenho limitados (Bom et al., 2019).

A estabilidade de emulsões cosméticas pode ser desafiadora, uma vez que a emulsão é a forma cosmética onde ocorre a dispersão de dois líquidos imiscíveis – água e óleo por meio de emulsificantes. O emulsificante permite a redução da tensão superficial entre as moléculas de água e óleo e possibilita uma melhor dispersão das

fases ímicíveis com a formação de micelas. O processo de emulsificação é um processo dinâmico e não espontâneo que necessita de energia mecânica para ocorrer a formação das micelas. A fase dispersa é a fase localizada dentro da micela e a fase contínua é a fase externa. Os três tipos de emulsões são: óleo disperso em água (O/A), água dispersa em óleo (A/O) e as emulsões múltiplas onde a fase dispersa é uma emulsão óleo em água dispersa em óleo (O/A/O) ou emulsão água em óleo dispersa em água (A/O/A) (Goodarzi; Zendeboudi, 2019; Contreras-Ramírez et al., 2022).

As micelas são separadas pela força de van der Waals e possuem tendência de retornarem ao seu estado inicial de menor energia, ou seja, na sua forma ímicível. Portanto, a separação de fases é um fenômeno eventual que ocorre ao longo do tempo. Esta instabilidade da emulsão pode acontecer como: separação gravitacional, floculação, cremeação, sedimentação, coalescência, e maturação de Ostwald. A separação gravitacional, é a separação completa das fases ímicíveis e é irreversível. A floculação é a agregação de micelas, sendo um processo reversível. A cremeação é a formação de uma camada de micelas na superfície. A sedimentação é a formação de uma camada de micelas na parte inferior. Estes fenômenos ocorrem pela diferença de densidade de fase e são um processo reversível. A coalescência é a união de diversas micelas formando micelas maiores e é um processo irreversível. A maturação de Ostwald está relacionado com a difusão da fase dispersa das micelas menores para as maiores por meio da fase contínua ao longo do tempo. A velocidade desta difusão depende da solubilidade da fase dispersa na fase contínua e este processo é favorecido com o aumento da temperatura (Goodarzi; Zendeboudi, 2019; Contreras-Ramírez et al., 2022).

No desenvolvimento de formulações cosméticas, é de grande importância comprovar a estabilidade da emulsão por meio de testes de estabilidade. Estes testes são utilizados para confirmar o prazo de validade do produto cosmético, a fim de garantir a qualidade e compatibilidade da formulação sob diferentes condições de armazenamento. Uma vez que fatores extrínsecos podem influenciar a estabilidade do produto cosmético, tais como tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de embalagem e microorganismos. Também pode ocorrer a influência de fatores

intrínsecos, tais como incompatibilidade física e química dos ingredientes da formulação. A incompatibilidade física está relacionada com mudanças na aparência da formulação como a separação de fases. A incompatibilidade química está relacionada com mudanças no valor de pH, reações de oxidação-redução, hidrólise, interações com os ingredientes da formulação e interações dos ingredientes com o material da embalagem. Podem ser realizados dois tipos de testes de estabilidade. O teste de estabilidade acelerada que prevê a curto prazo a estabilidade da formulação. O teste de estabilidade a longo prazo ou de prateleira que confirma o prazo de validade estimado no teste de estabilidade acelerada. As condições de temperatura que podem ser utilizadas no teste de estabilidade acelerada variam de alta a baixa temperatura e/ou ciclos congelamento-descongelamento. A duração do teste pode variar de 15 dias (teste preliminar) a 3 - 6 meses ou até mesmo um ano. Os parâmetros organolépticos (aparência, cor e odor), físico-químicos (valor de pH, viscosidade, densidade, comportamento reológico e perfil de textura) e microbiológicos (contagem microbiana e teste de desafio) podem ser avaliados (Anvisa, 2005; Moraes do Carmo; Pereira; Gratieri, 2018; Maia Campos; D'Angelo Costa; Souza, 2022).

A determinação do comportamento reológico é uma ferramenta importante para ser avaliada durante a caracterização da formulação cosmética e na avaliação da sua estabilidade física. Uma vez que permite avaliar o comportamento de formulações cosméticas sob a ação da tensão de cisalhamento de acordo com o tempo. A maioria das formulações cosméticas são fluídos não-newtonianos e possuem o comportamento viscoelástico que é a capacidade de um fluído apresentar elasticidade e viscosidade simultaneamente. Os parâmetros utilizados para caracterizar a viscoelasticidade de um material são: módulo elástico G' e módulo viscoso G'' . Além disso, as formulações cosméticas apresentam o comportamento de cisalhamento que é o termo atual para fluidos pseudoplásticos. Este comportamento é caracterizado por uma diminuição da viscosidade com um aumento na taxa de cisalhamento. O que é interessante para facilitar o espalhamento da formulação cosmética na pele durante a aplicação. Porém, esta viscosidade deve se recuperar rapidamente após o cisalhamento para que a formulação permaneça como uma película na pele. A tixotropia é um parâmetro

importante para a avaliação das propriedades reológicas dos cosméticos. Consiste na capacidade do fluido reduzir a viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento e retornar a viscosidade inicial após cessar a tensão de cisalhamento. Este fenômeno é dependente do tempo e da recuperação do fluido (Huang, 2019; Maia Campos; D'Angelo Costa; Souza, 2022). O comportamento reológico pode ser avaliado por meio de reogramas de taxa de cisalhamento (1/s) por tensão de cisalhamento (D/cm²). Os parâmetros que podemos extrair dos reogramas são: viscosidade mínima aparente, tixotropia, índice de consistência e índice de fluxo. A viscosidade mínima aparente é calculada dividindo a taxa de cisalhamento por tensão de cisalhamento. A tixotropia é obtida por meio da integração dos pontos da curva reológica. Os índices de fluxo e de consistência é calculado por meio do modelo de Weale's Ostwald (Ferreira et al., 2020; Infante et al., 2021).

Outra ferramenta importante para a caracterização de formulações cosméticas é a determinação do perfil de textura. As propriedades mecânicas como: trabalho de cisalhamento, firmeza, coesão, consistência, índice de viscosidade e dureza podem ser avaliadas por meio do equipamento TA.XT[®] plus Texture Analyzer (Stable Micro systems[®], Inglaterra). Esta análise pode ajudar a prever as propriedades sensoriais das formulações como a espalhabilidade. A área positiva sob a curva resultante da avaliação do trabalho de cisalhamento versus o tempo obtida com a introdução de um probe na amostra, pode ser correlacionada com a espalhabilidade da formulação. O trabalho de cisalhamento é inversamente proporcional a espalhabilidade. O menor valor do trabalho de cisalhamento corresponde a uma melhor espalhabilidade (Calixto; Infante; Maia Campos, 2018). A espalhabilidade é uma característica sensorial que se refere à facilidade com que o produto cosmético se espalha sobre a pele (Liu; Xu; Guo, 2007; Tai; Bianchini; Jachowicz, 2014; Calixto; Infante; Maia Campos, 2018; Gore; Picard; Savary, 2018; Maia Campos; D'Angelo Costa; Souza, 2022).

A análise sensorial permite a avaliação da formulação cosmética frente a consumidores e/ou painel treinado. Esta etapa, durante a Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), é importante para obter um melhor direcionamento da formulação cosmética e garantir a aceitabilidade pelos consumidores. A pesquisa sensorial com painel treinado,

geralmente se faz com menos participantes de pesquisa ($n = 8-20$) que receberam treinamento prévio sobre como analisar as características sensoriais de modo descritivo. As análises descritivas utilizadas na pesquisa sensorial com painel treinado podem ser realizadas por meio de dois métodos, tais como Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) e o método Spectrum™ Análise Descritiva (SDA). Nestes métodos os painelistas descrevem e quantificam determinados atributos sensoriais por meio de uma escala de intensidade. Os resultados ficam mais robustos e consistentes. A pesquisa com consumidores utiliza um número maior de painel com consumidores ($n = 50-100$) para minimizar a variabilidade de resposta. Os métodos utilizados são qualitativos, tais como as questões de *Check-all-that-apply* (CATA) e as escalas de interesse. Os questionários CATA obtêm informações sobre as percepções do consumidor por meio de perguntas de múltipla escolha sobre atributos sensoriais, após experimentarem o produto cosmético. A escala de interesse é um método baseado na classificação do produto cosmético através de uma escala de intensidade contendo as características sensoriais definidas pelo pesquisador (Varela; Ares, 2012; Gilbert et al., 2013; Maia Campos; D'Angelo Costa; Souza, 2022).

Em paralelo com as etapas do desenvolvimento de formulações cosméticas, a eficácia clínica pode ser comprovada por meio da aplicação de técnicas de biofísica e análise de imagem da pele. Para isso, são recrutadas participantes de pesquisa, de acordo com critérios pré-definidos de inclusão para utilizar a formulação cosmética por um período específico nas reais condições de uso dos produtos. Ao final do estudo, geralmente a avaliação da eficácia percebida é realizada, a fim de verificar se as participantes de pesquisa perceberam a melhora da pele com o uso cosmético (Serup, 2001; Cosmetics Europe, 2008; Maia Campos; D'Angelo Costa; Souza, 2022).

As medidas instrumentais são realizadas ao longo do período de estudo sob condições climatizadas e controladas. Todos os métodos avaliados são considerados não invasivos. Dentre estas, podemos mencionar as técnicas para a avaliação da hidratação, perda de água transepidermica, propriedades mecânicas e microrrelevo cutâneo (Gonçalves; Maia Campos, 2009; Maia Campos et al., 2021; Melo et al., 2021; Maia Campos; D'Angelo Costa; Souza, 2022).

A hidratação da pele pode ser medida pelo equipamento Corneometer® (Courage-Khazaka®, Alemanha). A avaliação do conteúdo aquoso do estrato córneo é realizada pelo método de capacitância da constante dielétrica da água. A perda de água transepidérmica pode ser medida pelo equipamento Tewameter® (Courage-Khazaka®, Alemanha). A avaliação da barreira cutânea é realizada pelo método de evaporação de água da pele (Berardesca et al., 2018). A pele envelhecida apresenta uma pele mais ressecada com uma barreira cutânea prejudicada.

A avaliação das propriedades mecânicas da pele, tais como elasticidade, viscoelasticidade e plasticidade vêm sendo avaliadas pelo método de sucção cutânea. O equipamento padrão utilizado para realizar esta medida é o Cutometer® (Courage-Khazaka®, Alemanha), onde uma pressão negativa deforma a pele mecanicamente para dentro do probe e após algum tempo esta pressão é aliviada. A resistência da pele à pressão negativa é a firmeza da pele. A habilidade de retornar a posição inicial é a elasticidade. É comum a pele envelhecida apresentar perda de elasticidade e este retorno ser mais demorado para voltar a posição inicial (Ryu et al., 2008; Ohshima et al., 2013; Maia Campos; Melo; Siqueira César, 2019).

O microrrelevo cutâneo pode ser avaliado por meio de imagens capturadas pelo equipamento Visioscan® (Courage-Khazaka®, Alemanha). O método utilizado de Avaliação da Superfície da Pele Viva ou seu nome em inglês SELS® (*Surface Evaluation of the Living Skin*) é baseado em uma escala de cinza determinados pelo *software* do equipamento. Os parâmetros avaliados são: suavidade da pele (Sesm), rugosidade da pele (Ser), descamação (Sesc), rugas (Sew). O microrrelevo cutâneo sofre alterações com o envelhecimento da pele, uma vez que a presença de rugas é mais frequente (Lévêque, 1999; Pierard; Uhoda; Pierard-Franchimont, 2003; Maia Campos et al., 2021).

Além disso, as técnicas avançadas de análise de imagem permitem o estudo das características morfológicas e estruturais da epiderme e derme, bem como a avaliação da eficácia de produtos dermocosméticos (Gonçalves; Maia Campos, 2009; Infante; Bagatin; Maia Campos, 2021; Maia Campos; D'Angelo Costa; Souza, 2022).

O Microscópio Confocal de Reflectância - Vivascope® (Lucid®, Estados Unidos) captura múltiplas imagens de alta resolução (1000 X 1000 pixels) em profundidade e/ou região específica da pele de forma próxima a histológica sem a necessidade de coleta de biópsia da pele de forma não invasiva e em condições reais de uso do produto cosmético. O microscópio usa fonte a laser com o comprimento de onda de 830 nm, poder de iluminação de 20 mW, objetiva de imersão e uma velocidade de captura de 20 imagens por segundo. As imagens microscópicas e macroscópicas são obtidas a partir do sistema de obtenção de imagem Vivastack® e câmera macroscópica digital com qualidade dermatoscópica (VivaCam®), respectivamente. As imagens obtidas por meio do Vivastack® possuem o “valor z” que corresponde a profundidade da imagem e a diferença deste “valor z” permite o cálculo da espessura das camadas da epiderme. Com este valor, podemos analisar os parâmetros quantitativos da pele, tais como espessura da epiderme, do estrato córneo, da camada granulosa e profundidade das papilas dérmicas. Os parâmetros morfológicos avaliados por meio das análises das imagens são: reflectância do estrato córneo, morfologia do estrato córneo, organização dos queratinócitos – padrão favo de mel; brilho dos interqueratinócitos, quantidade e o formato das papilas dérmicas, padrão de pigmentação da pele e estrutura da rede de colágeno. Este parâmetros morfológicos podem ser quantificados por meio do uso de escores padronizados pelo grupo de pesquisa NEATEC ou descritos na literatura relatada (Manfredini et al., 2013; Mercurio; Maia Campos, 2015; Shahriari et al., 2021; D'Angelo Costa; Maia Campos, 2021; Infante; Maia Campos, 2022).

O ultrassom de alta frequência de 20 MHz– Dermascan® (Cortex Technology®, Dinamarca) produz imagens da pele em tempo real por meio da reflexão de ondas ultrassônicas de alta frequência nas estruturas da pele que geram ecos de diferentes amplitudes. A intensidade deste eco é visualizada em uma imagem bidimensional colorida. Esta imagem colorida segue uma escala de cores de ecogenicidade do branco> amarelo> vermelho> verde> azul> preto, sendo o branco uma alta reflexão e o preto uma baixa reflexão. O colágeno possui uma alta reflexão e quanto maior for a sua presença na derme, mais colorida a imagem irá ficar. Os parâmetros que podem ser

avaliados com este equipamento são: espessura e ecogenicidade da derme (Lee et al., 2008; Maia Campos; Melo; Siqueira César, 2019).

Por fim, as técnicas de avaliação de eficácia acima descritas, tanto as objetivas por avaliação instrumental e subjetivas por análise sensorial e percepção da eficácia vêm sendo muito utilizadas pelo grupo de pesquisa para avaliar cientificamente os reais benefícios das formulações cosméticas (Mercurio et al., 2016; Calixto; Maia Campos, 2017; Bonilha; Maia Campos; Costa, 2020; Infante; Bagatin; Maia Campos, 2021; D'Angelo Costa; Maia Campos, 2021).

Nesse contexto, o presente estudo apresenta contribuição relevante com o desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de fotoprotetores e formulações cosméticas contendo antioxidantes inovadores visando a obtenção de um produto com eficácia clínica comprovada na prevenção e tratamento de alterações cutâneas relacionadas ao fotoenvelhecimento.

2. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais deste trabalho, foi possível concluir que:

- O Delineamento experimental do tipo fatorial otimizou o desenvolvimento de formulações cosméticas contendo ingredientes naturais e resultou no desenvolvimento racional de formulações cosméticas com propriedades sensoriais e físico-mecânicas adequadas para aplicação tópica. A formulação cosmética contendo a associação do extrato de oliva com a *Spirulina* sp. apresentou boas propriedades sensoriais e de espalhabilidade.
- Todas as formulações contendo os antioxidantes de estudo - *Spirulina* sp., extrato de oliva padronizado em hidroxitirosol e tetraisopalmitato de ascorbila reduziram significativamente a hiperpigmentação da pele após o período de estudo de seis semanas. A eficácia percebida pelas participantes de pesquisa foi mais pronunciada para a formulação contendo a *Spirulina* sp. na redução das manchas da pele em relação aos outros antioxidantes estudados.
- O uso de uma formulação cosmética contendo o tetraisopalmitato de ascorbila por seis semanas foi eficaz na melhora da qualidade do estrato córneo e do padrão de favo de mel da epiderme, além de aumentar a hidratação da epiderme viável e a densidade de colágeno. Além disso, as participantes de pesquisa notaram a melhora na luminosidade, hidratação da pele, e redução de rugas após a aplicação das formulações.
- A aplicação do Delineamento experimental do tipo fatorial otimizou o desenvolvimento de protetores solares. As interações dos fatores como tipo de emulsificante e concentração foram significativas. As formulações escolhidas pelo DOE, F1 e F3, foram consideradas estáveis, com boas propriedades sensoriais, valores de FPS acima de 30 e comportamento pseudoplástico não Newtoniano. A formulação com os melhores parâmetros foi F1, pois apresentou o maior valor de FPS e tixotropia ótima. Portanto, foi possível desenvolver protetores solares eficazes por meio da aplicação do DOE e avaliação das propriedades mecânicas e sensoriais.

- A formulação contendo a associação de extrato de oliva e *Spirulina* sp. em estudo mostrou estabilidade física e apresentou boas propriedades sensoriais e de espalhabilidade. Além disso, aumentou a hidratação na pele e melhorou a barreira cutânea após o uso por 12 semanas. A ecogenicidade da derme aumentou para ambos os grupos avaliados, ou seja, para o grupo que usou o fotoprotetor mais a formulação veículo e para o grupo que usou o fotoprotetor mais a formulação contendo os ingredientes ativos em estudo. A melhora nas características morfológicas e estruturais da pele foi observada apenas após o uso da formulação com os antioxidantes por 12 semanas. Portanto, a associação de extrato de oliva e *Spirulina* sp. foi eficaz para reduzir as alterações cutâneas relacionadas ao fotoenvelhecimento.

Por fim, dentre os três antioxidantes estudados, a *Spirulina* sp. apresentou os melhores resultados de eficácia clínica na melhora da pele fotoenvelhecida, podendo ser considerada uma substância ativa multifuncional.

3. REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Abihpec; Sebrae. Caderno de Tendências Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticas 2019-2020 [Internet]. Brasil; 2019 [citado 2 fev. 2023]. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/>.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Cosmetic Products Stability Guide, 1st ed. Brasília: National Health Surveillance Agency ANVISA; 2005 1:1-52.

AlFadhly NKZ, Alhelfi N, Altemimi AB, Verma DK, Cacciola F, Narayanankutty A. Trends and Technological Advancements in the Possible Food Applications of Spirulina and Their Health Benefits: A Review. *Molecules* 2022 27:5584.

Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol.* 2013 May;93(3):261-7.

Antony J, editor. Design of Experiments for Engineers and Scientists (Second Edition). Elsevier; 2014b. Chapter 6, Full Factorial Designs; p. 63-85.

Antony J, editor. Design of Experiments for Engineers and Scientists (Second Edition). Elsevier; 2014a. Chapter 2 - Fundamentals of Design of Experiments; p. 7-17.

Bağcı IS, Ruini C, Niesert AC, Horváth ON, Berking C, Ruzicka T, von Braunmühl T. Effects of short-term moisturizer application in different ethnic skin types: noninvasive assessment with optical coherence tomography and reflectance confocal microscopy. *Skin Pharmacol Physiol.* 2018 31(3):125–133.

BASF Schweiz AG, 2009. Sunscreen Simulator. Disponível em: <http://www.basf.com/sunscreen-simulator>. Accessed Jan 2021.

BASF. UV Filters. Technical Information 04_050103e-22. 2014;Dec:1-20.

Berardesca E, Loden M, Serup J, Masson P, Rodrigues LM. The Revised EEMCO Guidance for the In Vivo Measurement of Water in the Skin. *Ski Res Technol.* 2018 24(3):351–358.

Boireau-Adamezyk E, Baillet-Guffroy A, Stamatias GN. Age-dependent changes in stratum corneum barrier function. *Skin Res Technol.* 2014 20(4):409-15.

Bom S, Jorge J, Ribeiro HM, Marto J. A Step Forward on Sustainability in the Cosmetics Industry: a review. *J Clean Prod.* 2019 225:1-52.

Bonilha GC, Maia Campos PMBG, D'Angelo Costa GM. Rheological, Texture, and Sensory Analyses and In Vivo Clinical Efficacy of Cosmetic Formulations Containing Ascorbyl Tetraisopalmitate. *Biomed Biopharm Res J.* 2020 17(1):1–12.

Bradley EJ, Griffiths CEM, Sherratt MJ, Bell M, Watson REB. Over-the-counter anti-ageing topical agents and their ability to protect and repair photoaged skin. *Maturitas* 2015 80:265–272.

BRASIL. Anvisa. Resolution - RDC No 30, June 01st, 2012 Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 jun. 2012. Section 1, p. 83.

Burke KE. Mechanisms of aging and development-A new understanding of environmental damage to the skin and prevention with topical antioxidants. *Mech Ageing Dev.* 2018 Jun;172:123-130.

Buzzo CMVDC, Converte A, da Silva JA, Apolinário AC. Quality by design enabled the development of stable and effective oil-in-water emulsions at compounding pharmacy: the case of a sunscreen formulation. *Pharm Dev Technol.* 2021;Dec;26(10):1090-1101.

Calixto LS, Infante VHP, Maia Campos PMBG. Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements. *AAPS PharmSciTech.* 2018 May;19(4):1512-1519.

Calixto LS, Maia Campos PMBG. Physical Mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and sensorial properties. *International Journal of Cosmetic Science.* 2017 39:527-534.

Campos PM, Gianeti MD, Mercurio DG, Gaspar LR. Synergistic effects of green tea and ginkgo biloba extracts on the improvement of skin barrier function and elasticity. *J Drugs Dermatol.* 2014 Sep;13(9):1092-7.

César FCS, Maia Campos PMBG. Influence of vegetable oils in the rheology, texture profile and sensory properties of cosmetic formulations based on organogel. *Int J Cosmet Sci.* 2020 42(5):494-500.

Chaoa C, Génota C, Rodriguezb C, et al. Emollients for cosmetic formulations: Towards relationships between physico-chemical properties and sensory perceptions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2018 536:156–164

Chen J, Liu Y, Zhao Z, Qiu J. Oxidative stress in the skin: Impact and related protection. *Int J Cosmet Sci.* 2021 43(5):495-509.

COLIPA, Guideline for Monitoring UV Radiation Sources, 2007.

Contreras-Ramírez JI, Patel AR, Gallegos-Infante JÁ, Toro-Vázquez JF, Pérez-Martínez JD, Rosas-Flores W, González-Laredo RF. Organogel-Based Emulsified Systems, Food Applications, Microstructural and Rheological Features - A Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry.* 2022 12(2):1601-1627.

Corauce D, Camargo FB Jr, Maia Campos PMBG, inventors. Universidade de Sao Paulo (USP) and Ouro Fino Participações e Empreendimentos S/A, assignee. Spirulina containing cosmetic composition and cosmetic treatment method. US20140023676A1. January 23, 2014.

Cosmetics Europe. Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetics Products; COLIPA Guidelines: Brussels, 2008.

Costa GMD, Alves GDAD, Maia Campos PMBG. Application of design of experiments in the development of cosmetic formulation based on natural ingredients. *Int J Phytocos Nat Ingred*. 2019 6:4.

Croda. Crodafos™ CES SPF study. Catalog DS-88R-2. 2010;Apr:1-4.

D'Angelo Costa GM, Maia Campos PMBG. Efficacy of topical antioxidants in the skin hyperpigmentation control: A clinical study by reflectance confocal microscopy. *J Cosmet Dermatol*. 2021 20(2):538-545.

de Melo MO, Maia Campos PMBG. Application of biophysical and skin imaging techniques to evaluate the film-forming effect of cosmetic formulations. *Int J Cosmet Sci*. 2019 Dec;41(6):579-584.

Delsin S, Mercurio D, Fossa MM, Maia Campos PMBG. Clinical Efficacy of Dermocosmetic Formulations Containing Spirulina Extract on Young and Mature Skin: Effects on the Skin Hydrolipidic Barrier and Structural Properties. *Clin Pharmacol Biopharm*. 2015 04(04): 1-5.

Draelos ZD. The science behind skin care: Moisturizers. *J Cosmet Dermatol*. 2018 17(2):138-144.

Dubuisson P, Picard C, Grisel M, Savary G. How does composition influence the texture of cosmetic emulsions? *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2018 536 (5):38-46.

Dunaway S, Odin R, Zhou L, Ji L, Zhang Y, Kadekaro AL. Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. *Front Pharmacol*. 2018 Apr 24;9:392.

Epstein JH. Phototoxicity and photoallergy. *Semin Cutan Med Surg*. 1999;18(4):274-84.

Estanqueiro M, Amaral MH, Sousa Lobo JM. Comparison between sensory and instrumental characterization of topical formulations: impact of thickening agents. *Int J Cosmet Sci*. 2016 Aug;38(4):389-98.

Ezz El-Din Ibrahim, M.; Alqurashi, R.M.; Alfaraj, F.Y. Antioxidant Activity of Moringa oleifera and Olive Olea europaea L. Leaf Powders and Extracts on Quality and Oxidation Stability of Chicken Burgers. *Antioxidants*. 2022 11:496.

Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci*. 2008 30(2):87-95.

Felippim EC, Marcato PD, Maia Campos PMBG. Development of Photoprotective Formulations Containing Nanostructured Lipid Carriers: Sun Protection Factor, Physical-Mechanical and Sensorial Properties. *AAPS PharmSciTech*. 2020 Nov 8;21(8):311.

Ferreira VTP, Infante VHP, Felippim EC, Campos PMBGM. Application of Factorial Design and Rheology to the Development of Photoprotective Formulations. *AAPS PharmSciTech*. 2020 Jan 3;21(2):46.

Fonseca-Santos B, Corrêa MA, Chorilli M. Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. *Braz J Pharm*. 2015 51(1):17-26.

Forestier S. Rationale for sunscreen development. *J Am Acad Dermatol*. 2008 May;58(5 Suppl 2):S133-8.

Gaspar LR, Maia Campos PM. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *Int J Pharm*. 2003 Jan 2;250(1):35-44.

Gianeti MD, Gaspar LR, Camargo FB Jr, Campos PM. Benefits of combinations of vitamin A, C and E derivatives in the stability of cosmetic formulations. *Molecules*. 2012 Feb 22;17(2):2219-30.

Gianeti MD, Maia Campos PMBG. Efficacy evaluation of a multifunctional cosmetic formulation: the benefits of a combination of active antioxidant substances. *Molecules*. 2014 10;19(11):18268-82.

Gilbert L, Savary G, Grisel M, Picard C. Predicting Sensory Texture Properties of Cosmetic Emulsions by Physical Measurements. *Chemom Intell Lab Syst*. 2013 124:21–31.

Gillbro JM, Olsson MJ. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents—existing and new approaches. *Int J Cosmet Sci*. 2011 33:210-221.

Gioia F, Celleno L. The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. *Skin Res Technol*. 2002 8(3):178-86.

Goldberg DJ, Mraz-Robinson D, Granger C. Efficacy and safety of a 3-in-1 antiaging night facial serum containing melatonin, bakuchiol, and ascorbyl tetraisopalmitate through clinical and histological analysis. *J Cosmet Dermatol*. 2020 19(4):884-890.

Gonçalves GMS, Maia Campos PMBG. Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009 45(1):1-10.

Gönüllü U, Yener G, Uner M, Incegül T. Moisturizing potentials of ascorbyl palmitate and calcium ascorbate in various topical formulations. *Int J Cosmet Sci*. 2004 26(1):31-6.

Goodarzi F, Zendehboudi S. A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2019 97:281–309.

Gore E, Picard C, Savary G. Spreading Behavior of Cosmetic Emulsions: Impact of the Oil Phase. *Biotribology*. 2018 16:17–24.

Grand View Research. Natural Skin Care Products Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type (Mass, Premium), By Product (Facial Care, Body Care), By End-use (Men, Women), By Distribution Channel, By Region, and Segment Forecasts, 2022 – 2030. [Internet], 2022b. [citado 21 fev 2023]. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/natural-skin-care-products-market>.

Grand View Research. Organic Personal Care Market Size Worth \$42.19 Billion By 2030. [Internet]. São Francisco; 2022a [citado 2 fev. 2023]. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-organic-personal-care-market>.

Gu Y, Han J, Jiang C, Zhang Y. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Res Rev*. 2020 May;59:101036

Guan LL, Lim HW, Mohammad TF. Sunscreens and Photoaging: A Review of Current Literature. *Am J Clin Dermatol*. 2021 Nov;22(6):819-828.

Guerrero D. Dermocosmetic management of hyperpigmentations. *Ann Dermatol Venereol*. 2012 139 Suppl 4:S166-9.

Han A, Chien AL, Kang S. Photoaging. *Dermatologic Clinics*. 2014 32:291–299.

Haytoglu NS, Gurel MS, Erdemir A, Falay T, Dolgun A, Haytoglu TG. Assessment of skin photoaging with reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol*. 2014 Aug;20(3):363-72.

Hewitt J, Dahms GH. Rheology - its effect on physical SPF's. *Soap Perfum. Cosmet*. 1996 69;23-25.

Huang N. Rheological Characterization of Pharmaceutical and Cosmetic Formulations for Cutaneous Applications. *Curr Pharm Des*. 2019 25(21):2349–2363.

Infante VH, Maia Campos PMBG. Application of a Reflectance Confocal Microscopy Imaging Analysis Score for the Evaluation of Non-Melanogenic Changes in Male Photoaged Skin. *Photochem Photobiol*. 2022 Sep 13 [Epub ahead of print].

Infante VHP, Bagatin E, Maia Campos PMBG. Skin photoaging in young men: A clinical study by skin imaging techniques. *Int J Cosmet Sci*. 2021 43:341-351.

Infante VHP, Leite MGA, Maia Campos PMBG. Film-Forming Properties of Topical Formulations for Skin and Hair: In Vivo and In Vitro Studies Using Biophysical and Imaging Techniques. *AAPS PharmSciTech*. 2022 Dec 28;24(1):29.

Infante VHP, Maia Campos PMBG, Calixto LS, Darvin ME, Kröger M, Schanzer S, Lohan SB, Lademann J, Meinke MC. Influence of physical-mechanical properties on

SPF in sunscreen formulations on ex vivo and in vivo skin. *Int J Pharm.* 2021 Apr 1;598:120262.

Iriyama S, Ono T, Aoki H, Amano S. Hyperpigmentation in human solar lentigo is promoted by heparanase-induced loss of heparan sulfate chains at the dermal-epidermal junction. *Journal of Dermatological Science.* 2011 64:223–228.

ISO 24444 Sun Protection Test Methods – in-vivo Determination of Sun Protection Factor (SPF), 2019.

Jagdeo J, Kurtti A, Hernandez S, Akers N, Peterson S. Novel Vitamin C and E and Green Tea Polyphenols Combination Serum Improves Photoaged Facial Skin. *J Drugs Dermatol.* 2021 Sep 1;20(9):996-1003.

Jesus A, Mota S, Torres A, Cruz MT, Sousa E, Almeida IF, Cidade H. Antioxidants in Sunscreens: Which and What For? *Antioxidants (Basel).* 2023 Jan 6;12(1):138.

Jesus A, Sousa E, Cruz MT, Cidade H, Lobo JMS, Almeida IF. UV Filters: Challenges and Prospects. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022 Feb22;15(3):263.

Kakuda L, Maria Berardo Gonçalves Maia Campos P, Bordini Zanin R, Noronha Favaro L. Development of multifunctional sunscreens: Evaluation of Physico-mechanical and film-forming properties. *Int J Pharm.* 2023 Feb 13:122705.

Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skinaging. *Ageing Research Reviews.* 2015 21:16–29.

Kanlayavattanakul M, Lourith N. Skin hyperpigmentation treatment using herbs: A review of clinical evidences. *J Cosmet Laser Ther.* 2018 20(2):123-131.

Karkos PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, Assimakopoulos DA. Spirulina in clinical practice: evidence-based human applications. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011 531053:1-4.

Kaur IP, Kapila M, Agrawal R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. *Ageing Res Rev.* 2007 Dec;6(4):271-88.

Krutmann J, Boulloc A, Sore G, Bernard BA, Passeron T. The skin aging exposome. *J Dermatol Sci.* 2017 Mar;85(3):152-161.

Krutmann J, Schalka S, Watson REB, Wei L, Morita A. Daily photoprotection to prevent photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2021 Nov;37(6):482-489.

Lee HK, Seo YK, Baek JH, Koh JS. Comparison between Ultrasonography (Dermascan C Version 3) and Transparency Profilometry (Skin Visiometer SV600). *Ski Res Technol.* 2008 14(1):8–12.

Lévêque, J. EEMCO Guidance for the Assessment of Skin Topography. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 1999 12(2):103–114.

Liu H, Xu XM, Guo SD. Rheological, Texture and Sensory Properties of Low-Fat Mayonnaise with Different Fat Mimetics. *LWT—Food Sci. Technol.* 2007 40(6):946–954.

Longo C, Casari A, De Pace B, Simonazzi S, Mazzaglia G, Pellacani G. Proposal for an in vivo histopathologic scoring system for skin aging by means of confocal microscopy. *Skin Res Technol.* 2013 19(1):e167-73.

Lu Q, Yang C, Wu J, et al. Confocal laser scanning microscopy, a diagnostic alternative for five pigmented lesions on the face: An observational study. *Skin Res Technol.* 2019 25:871-876.

Ma Y, Yoo J. History of sunscreen: An updated view. *J Cosmet Dermatol.* 2021 Apr;20(4):1044-1049.

Machado NCF, Santos LD, Carvalho BG, Singh P, Téllezsoto CA, Azoia NG, Cavaco-Paulo A, Martin AA, Favero PP. Assessment of penetration of Ascorbyl Tetraisopalmitate into biological membranes by molecular dynamics. *Computers in Biology and Medicine.* 2016;75:151–159.

Maddiboyina B, Vanamamalai HK, Roy H, Ramaiah, Gandhi S, Kavisri M, et al. Food and drug industry applications of microalgae *Spirulina platensis*: a review. *J Basic Microbiol.* 2023 1–11.

Maia AM, Baby AR, Pinto CA, Yasaka WJ, Suenaga E, Kaneko TM, Velasco MV. Influence of sodium metabisulfite and glutathione on the stability of vitamin C in O/W emulsion and extemporaneous aqueous gel. *Int J Pharm.* 2006 Sep 28;322(1-2):130-5.

Maia Campos PMBG, Benevenuto CG, Calixto LS, Melo MO, Pereira KC, Gaspar LR. *Spirulina*, *Palmaria Palmata*, *Cichorium Intybus*, and *Medicago Sativa* extracts in cosmetic formulations: an integrated approach of in vitro toxicity and in vivo acceptability studies. *Cutan Ocul Toxicol.* 2019 38(4):322-329.

Maia Campos PMBG, Camargo Jr FB, Corauce D, inventors; Ouro Fino Participações e Empreendimentos S.A.; Universidade de São Paulo – Usp, assignees. Composição cosmética contendo spirulina, e, método de tratamento cosmético. Patente brasileira WO 2012135928 A1. 12 out. 2012.

Maia Campos PMBG, D'Angelo Costa GM. Evaluation of the influence of the application of a cosmetic formulation on the skin morphological characteristics by Reflectance Confocal Microscopy. *Biomed Biopharm Res.* 2022 19(1):1-14.

Maia Campos PMBG, D'Angelo Costa, GM, Souza, CRF. Chapter 9 - Plant-Based Cosmetic Products. In: *Phytotechnology: a sustainable platform for the development of*

herbal products / edited by Wanderley Pereira Oliveira. First edition. | Boca Raton: Taylor and Francis, 2022. p. 233-254.

Maia Campos PMBG, Franco RSB, Kakuda L, Cadioli GF, Costa GMD, Bouvret E. Oral Supplementation with Hydrolyzed Fish Cartilage Improves the Morphological and Structural Characteristics of the Skin: A Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study. *Molecules*. 2021 Aug 12;26(16):4880.

Maia Campos PMBG, Gianeti MD, Camargo Jr FB, Gaspar LR. Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: Stability studies and in vivo efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012 82:580–586.

Maia Campos PMBG, Gonçalves GMS, Gaspar LR. In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy of topical formulations containing vitamin C and its derivatives studied by non-invasive methods. *Skin Res Technol*. 2008 14:376-380.

Maia Campos PMBG, Melo MO, Mercurio DG. Assessment of skin photoaging with reflectance confocal microscopy. In: Issa MCA, Tamura B, eds. *Daily Routine in Cosmetic Dermatology, Clinical Approaches and Procedures in Cosmetic Dermatology*. New York: Springer International Publishing AG; 2016. p. 1-10.

Maia Campos PMBG, Melo MO, Siqueira César FC. Topical Application and Oral Supplementation of Peptides in the Improvement of Skin Viscoelasticity and Density. *J Cosmet Dermatol*. 2019 18(6):1693–1699.

Maier T, Korting HC. Sunscreens - which and what for? *Skin Pharmacol Physiol*. 2005 Nov-Dec;18(6):253-62.

Manfredini M, Mazzaglia G, Ciardo S, Simonazzi S, Farnetani F, Longo C, Pellacani G. Does skin hydration influence keratinocyte biology? In vivo evaluation of microscopic skin changes induced by moisturizers by means of reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol*. 2013 Aug;19(3):299-307. doi: 10.1111/srt.12042. Epub 2013 Feb 26. Erratum in: *Skin Res Technol*. 2014 Aug;20(3):388. Marco, Manfredini [corrected to Manfredini, Marco]; Giovanna, Mazzaglia [corrected to Mazzaglia, Giovanna]; Silvana, Ciardo [corrected to Ciardo, Silvana]; Silvia, Simonazzi [corrected to Simonazzi, Silvia]; Francesca, Farnetani [corrected to Farnetani, Fr].

Martini APM, Maia Campos PMBG. Influence of visible light on cutaneous hyperchromias: clinical efficacy of broad-spectrum Sunscreens. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2018 34:241-248.

Martini APM, Mercurio DG, Maia Campos PMBG. Assessment of skin pigmentation by confocal microscopy: influence of solar exposure and protection habits on cutaneous hyperchromias. *J Cosmet Dermatol*. 2017;16(3):364-369.

Massia D, Nardini P, Giorgi VD, Carli P. Simultaneous occurrence of multiple melanoma in situ on sundamaged skin (lentigo maligna), solar lentigo and labial melanosis: the

value of dermoscopy in diagnosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 1999 13:193-197.

Melo M, Moraes V, Camargo Junior F, Maia Campos P. Rheological behavior and clinical efficacy of photoprotective cosmetic formulations with Spirulina. *Int J Phytocos Nat Ingrid*. 2021 8:9.

Mercurio DG, Jdid R, Morizot F, Masson P, Maia Campos PMBG. Morphological, structural and biophysical properties of French and Brazilian photoaged skin. *British Journal of Dermatology*. 2016 174:553-561.

Mercurio DG, Maia Campos PMBG. Microscopia confocal de reflectância como suporte para a avaliação clínica das alterações do envelhecimento cutâneo. *Surgical & Cosmetic Dermatology* 2015 7(3):236-240.

Miner PE. Chapter 9 - Emulsion rheology: creams and lotions. In: Laba D. editor. *Rheological Properties of Cosmetic and Toiletries*, New York:Marcel Dekker, 1993. p 313-370.

Miralles P, Chisvert A, Salvador A. Determination of hydroxytyrosol and tyrosol by liquid chromatography for the quality control of cosmetic products based on olive extracts. *J Pharm Biomed Anal*. 2015 102:157-161.

Moraes do Carmo AC, Pereira RS, Gratieri T. Brazilian Requirements for Stability Indicating Methods. *TrAC Trends Anal Chem*. 2018 98:58–63.

Nahas AF, Abdel-Malek ZA, Kohli I, Braunberger TL, Lim HW, Hamzavi IH. The potential role of antioxidants in mitigating skin hyperpigmentation resulting from ultraviolet and visible light-induced oxidative stress. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2019 35:420-428.

Narda M, Brown A, Muscatelli-Groux B, Grimaud JA, Granger C. Epidermal and Dermal Hallmarks of Photoaging are Prevented by Treatment with Night Serum Containing Melatonin, Bakuchiol, and Ascorbyl Tetraisopalmitate: In Vitro and Ex Vivo Studies. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2020 10(1):191-202.

Nikko Chemicals. Nikkomulse™ 41. Catalog(E) S012235_20110728. 2005;Nov:1-8.

Nishad J. Chapter 5 - Stability of plant extracts. In: Mir SA, Manickavasagan A, Shah MA, editors. *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*. Academic Press, 2022, p. 89-126.

Nogueira C, Pacheco CRS, Arrelano DB, Botega DCZ, Mathias Netto ML, inventors; Chemyunion Quimica LTDA, assignee. Structuring of cosmetic composition using organogels. United States patent US 2016/0045426A1. 2016.

Ochiai Y, Kaburagi S, Obayashi K, Ujiie N, Hashimoto S, Okano Y, Masaki H, Ichihashi M, Sakurai H. A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP),

- prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. *J Dermatol Sci.* 2006 44(1):37-44.
- Ogden E, Schofield J. Benign skin lesions. *Medicine.* 2013 41(7):406-408.
- Ohshima H, Kinoshita S, Oyobikawa M, Futagawa M, Takiwaki H, Ishiko A, Kanto H. Use of Cutometer Area Parameters in Evaluating Age-Related Changes in the Skin Elasticity of the Cheek. *Ski Res Technol.* 2013 19(1):e238–e242.
- Ortonne J-P, Bissett DL. Latest insights into skin hyperpigmentation. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2008 13:10-14.
- Osterwalder U, Sohn M, Herzog B. Global state of sunscreens. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2014 Apr-Jun;30(2-3):62-80.
- Pierard GE, Uhoda I, Pierard-Franchimont C. From Skin Microrelief to Wrinkles. An Area Ripe for Investigation. *J Cosmet Dermatol.* 2003 2(1):21–28.
- Politis SN, Colombo P, Colombo G, Rekkas DM. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017 43(6):889-901.
- Prasanth MI, Gayathri S, Bhaskar JP, Krishnan V, Balamurugan K. Analyzing the Synergistic Effects of Antioxidants in Combating Photoaging Using Model Nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Photochem Photobiol.* 2020 Jan;96(1):139-147.
- Radocaj O, Dimic E, Diosady LL, Vujasinovic V. Optimizing the texture attributes of a fat-based spread using instrumental measurements. *Journal of Texture Studies.* 2011 42,:394-403.
- Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL, Ramirez-Tortosa M. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Research International.* 2018 105:1-58.
- Ryu HS, Joo YH, Kim SO, Park KC, Youn SW. Influence of Age and Regional Differences on Skin Elasticity as Measured by the Cutometer. *Ski Res Technol.* 2008 14(3):354–358.
- Sahoo S, Kumar N, Bhattacharya C, Sagiri SS, Jain K, Pal K, Ray SS, Nayak B. Organogels: Properties and Applications in Drug Delivery, Designed Monomers and Polymers. 2011 14(2):95-108.
- Serup J. Efficacy Testing of Cosmetic Products. *Ski Res Technol.* 2001 7(3):141–151.
- Shahriari N, Grant-Kels JM, Rabinovitz H, Oliviero M, Scope A. Reflectance Confocal Microscopy. *J Am Acad Dermatol.* 2021 84(1):1–14.
- Silva GM, Maia Campos PMBG. Histopathological, morphometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in a skin care formulation. *Int J Cosmet Sci.* 2000 22(3):169-79.

- Silva S, Ferreira M, Oliveira AS, Magalhães C, Sousa ME, Pinto M, Sousa Lobo JM, Almeida IF. Evolution of the use of antioxidants in anti-ageing cosmetics. *Int J Cosmet Sci.* 2019 41(4):378-386.
- Smirnova MH. A will to youth: the woman's anti-aging elixir. *Soc Sci Med.* 2012 75 (7):1236-43.
- Smit N, Vicanova J, Pavel S. The hunt for natural skin whitening agents. *Int J Mol Sci.* 2009;10:5326-5349. Kanlayavattanakul M, Lourith N. Plants and natural products for the treatment of skin hyperpigmentation – A Review. *Planta Med.* 2018 84:988-1006.
- Soni RAS, Sudhakar K, Rana RS. Spirulina e From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology.* 2017 69:157-171.
- Souza C, Maia Campos PMBG. Development and photoprotective effect of a sunscreen containing the antioxidants Spirulina and dimethylmethoxy chromanol on sun-induced skin damage. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2017 104:52–64.
- Statista. Cosmetics & Personal Care Department. Size of the anti-aging market worldwide from 2021 to 2027. [Internet], 2023. [citado 2 fev. 2023]. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/509679/value-of-the-global-anti-aging-market/>.
- Sun Y, Zhoua D, Shahidi F. Antioxidant properties of tyrosol and hydroxytyrosol saturated fatty acid esters. *Food Chemistry.* 2018 245:1262-1268.
- Surya Teja SP, Damodharan N. 23 Full factorial model for particle size optimization of methotrexate loaded chitosan nanocarriers: a design of experiments (DoE) approach. *Biomed Res Int.* 2018 2018:7834159.
- Tai A, Bianchini R, Jachowicz J. Texture Analysis of Cosmetic/Pharmaceutical Raw Materials and Formulations. *Int J Cosmet Sci.* 2014 36(4):291–304.
- The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Integrated addendum to ICH E6(R1): Guideline for good clinical practice E6(R2). 2016. [citado 23 jun. 2020] Disponível em: https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf.
- Tobin DJ. Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability.* 2017 26:37-46.
- Toledo Bagatin J, Maia Campos PMBG, Bagatin E. A Pilot Clinical Study to Evaluate the Effectiveness of Olive Extract Containing Hydroxytyrosol for Oral and Topical Treatment of Melasma. *Biomed Biopharm Res J.* 2020 17 (1):1–15.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Majo DD, Giammanco S, Guardia ML. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev.* 2005 18:98-112.

United Nations. Department of Economic and Social Affairs. 2020 World Population Ageing: Highlights. [Internet], New York, 2020. [citado 01 fev. 2023]. Disponível em: https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/undesapd-2020_world_population_ageing_highlights.pdf.

Varela P, Ares G. Sensory Profiling, the Blurred Line between Sensory and Consumer Science. A Review of Novel Methods for Product Characterization. *Food Res Int.* 2012 48(2):893–908.

Vashi NA, Kundu RV. Facial hyperpigmentation: causes and treatment. *Br J Dermatol.* 2013 169(3):41-56. 4.

Wagemaker TAL, Maia Campos PMBG, Shimizu K, Kyotani D, Yoshida D. Antioxidant-based topical formulations influence on the inflammatory response of Japanese skin: a clinical study using non-invasive techniques. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;117:195-202.

World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013, 310, 2191–2194.

Yokota M, Yahagi S. Evaluation of the anti-wrinkle effect of a lipophilic pro-vitamin C derivative, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid. *J Cosmet Dermatol.* 2022 21(8):3503-3514.

Zhou D-Y, Sun Y-X, Shahidi F. Preparation and antioxidant activity of tyrosol and hydroxytyrosol esters. *Journal of Functional Foods.* 2017 37:66–73.

Zhu W, Gao J. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2008 13:20-24.

Zouboulis CC, Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clin Dermatol.* 2011 29(1):3-14.

