

## Evaluation of the influence of the application of a cosmetic formulation on the skin morphological characteristics by Reflectance Confocal Microscopy

*Avaliação da influência da aplicação de uma formulação cosmética nas características morfológicas da pele por Microscopia Confocal de Reflectância*

**Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos\* & Gabriela Maria D'Angelo Costa**

School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Av do Café, s/nº, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil 14040-903

corresponding author / autor para correspondência: pmcampos@usp.br

---

### Abstract

Reflectance Confocal Microscopy (RCM) is a non-invasive imaging technique with near-histological resolution that allows evaluation of the morphological and structural characteristics of the skin. In this context, the aim of the study was to evaluate the influence of the application of a cosmetic formulation on the skin morphological characteristics by RCM. The study included six female subjects, aged 40 to 50 years. Measurements in terms of epidermis thickness, dermal papillae depth (DPD), interkeratinocytes brightness (IB), furrows morphology, skin surface homogeneity (SSH), honeycomb pattern, skin hyperpigmentation, dermal papillae and dermis morphology were performed using RCM before and after a 90-day period of formulation application on the face. The studied formulation showed a significance increase of DPD after the 90 day period, showing an improvement on the dermal-epidermal junction (DEJ). In addition, an increase of IB in the granular layer and an improvement of dermis morphology were observed after the treatment. In conclusion, the obtained results by RCM showed an improvement of morphological characteristics of the skin after application of the studied cosmetic formulation for 90 day period when compared to the initial baseline, as it improved epidermis and dermoepidermal junction morphology.

**Keywords:** Clinical efficacy, Reflectance Confocal Microscopy, cosmetic formulation

---

### Resumo

A Microscopia Confocal de Reflectância (MCR) é uma técnica de imagem não invasiva com resolução próxima da histológica que permite avaliar as características morfológicas e estruturais da pele. Neste contexto, o objectivo do estudo foi avaliar a influência da aplicação de uma formulação cosmética nas características morfológicas da pele por MCR. O estudo incluiu seis mulheres, idade 40 a 50 anos. Medições em termos de espessura da epiderme, profundidade das papilas dérmicas (PPD), brilho interqueratinócitos (BI), morfologia dos sulcos, homogeneidade da superfície da pele (HSP), padrão de favo de mel, hiperpigmentação da pele, papilas dérmicas e morfologia da derme foram realizadas antes e após 90 dias de aplicação da formulação na face por MCR. A formulação estudada mostrou um aumento significativo da PPD e melhoria na morfologia da junção dérmico-epidérmica (JDE), após 90 dias de tratamento. Além disso, houve um aumento do BI na camada granular e melhoria da morfologia da derme. Em conclusão, os resultados obtidos por MCR mostraram melhoria das características morfológicas da pele após a aplicação da formulação cosmética estudada durante o período de 90 dias, em comparação com o basal – tempo inicial, uma vez que melhorou a morfologia das epiderme, papilas dérmicas e junção dermoepidérmica.

**Palavras-chave:** Eficácia clínica, Microscopia Confocal Reflectância, formulação cosmética

## Introduction

The search for active ingredients to improve the characteristics of skin aging is important for innovation in the cosmetic area. Thus, clinical efficacy studies are necessary to prove the effectiveness of cosmetic formulations containing these active ingredients (1,2,3).

Skin aging is a process induced by intrinsic and extrinsic factors (4). The changes of intrinsic aging are the presence of a thinner epidermis, decreased depth of the dermoepidermal junctions that compromise skin nutrition, and decrease basal cell proliferation (5,6). Solar radiation significantly contributes to accelerated skin aging by promoting photoaging, which results in skin changes such as an increased of collagen degradation, presence of solar elastosis and hyperpigmentations regardless of chronological age or sex (7,8).

There are active ingredients that can improve aged skin conditions. Peptides have been used in cosmetics since they have presented potential for the skin care (9). In addition, di- and tripeptides extracted from rice (*Oryza sativa*) are compatible with the skin and present potential for application in cosmetic formulation for the treatment of aging skin (10).

A previous study of our research group (Maia Campos et al., 2019) showed that a cosmetic formulation with di- e tripeptides from rice was effective in the improvement of skin elasticity and dermis density for women aged 40 to 50 years (10). Another study from our research group, Shirata et al (2021), showed that cosmetic formulations containing rice di- and tripeptides were effective for the improvement of skin hydration and the prevention of skin photodamage in young age groups (11). Thus, the evaluation of skin morphological and structural characteristics is very important to elucidate the efficacy of cosmetics in dermis epidermal junction, dermal papillae and collagen morphology in the papillary dermis.

Clinical studies using instrumental measurements such as non-invasive imaging techniques are very important to evaluate the efficacy of cosmetic products in real conditions of use (3,7,10,12). Reflectance Confocal Microscopy (RCM) is a non-invasive advanced imaging technique with near to histological resolution

## Introdução

A procura de ingredientes activos para melhorar as características do envelhecimento cutâneo é importante para a inovação na área cosmética. Assim, são necessários estudos de eficácia clínica para provar a eficácia de formulações cosméticas adicionadas destes princípios activos (1,2,3).

O envelhecimento cutâneo é um processo induzido por factores intrínsecos e extrínsecos (4). As alterações do envelhecimento intrínseco são a presença de uma epiderme mais fina, a diminuição da profundidade das junções dermoepidérmicas que comprometem a nutrição da pele e diminuem a proliferação das células basais (5,6). A radiação solar contribui significativamente para acelerar o envelhecimento cutâneo ao promover o fotoenvelhecimento, o que resulta em alterações cutâneas tais como um aumento da degradação do colagénio, presença de elastose solar e hiperpigmentações, independentemente da idade cronológica ou sexo (7,8).

Existem ingredientes activos que podem melhorar as condições da pele fotoenvelhecida. Os peptídeos têm sido utilizados em cosméticos desde que apresentam potencial para os cuidados da pele. (9). Além disso, di- e tripeptídeos extraídos do arroz (*Oryza sativa*) são compatíveis com a pele e vem mostrando eficácia na melhora das condições da pele envelhecida (10).

Um estudo anterior do nosso grupo de investigação (Maia Campos et al., 2019) mostrou que uma formulação cosmética contendo di- e tripeptídeos do arroz foi eficaz na melhora da elasticidade da pele e da densidade da derme de mulheres com idades entre os 40 e 50 anos (10). Outro estudo do nosso grupo de investigação, Shirata et al (2021), mostrou que formulações cosméticas com di e tripeptídeos do arroz foram eficazes na melhora da hidratação da pele e na prevenção do fotodano cutâneo em grupos etários jovens (11). Assim, a avaliação das características morfológicas e estruturais da pele é muito importante para elucidar a eficácia de cosméticos na junção dermo epidérmica, da derme papilar, papilas dérmicas e morfologia do colágeno na derme papilar.

Os estudos clínicos que utilizam medições instrumentais, tais como técnicas de imagem não invasivas, são muito importantes para avaliar a eficácia dos produtos dermocosméticos em condições reais de utilização (3,7,10,12). A Microscopia Confocal Reflectância (MCR) é uma técnica de imagem avançada não invasiva com uma resolução próxima da histológica que permite avaliar as características morfológicas e estruturais

that allows evaluation of morphological and structural skin characteristics in real time. It is a technique widely used in dermatology and can be applied in the cosmetic area to characterize different types of skin and evaluate the effectiveness of cosmetics without the need for biopsies (12, 13).

In this context, the application of RCM to evaluate the clinical efficacy of cosmetic formulations can bring an important contribution to elucidate the benefits of application of these formulations in the treatment of photoaged skin.

Thus, the aim of the study was to evaluate the influence of the application of a cosmetic formulation containing di- and tripeptides of hydrolyzed rice protein on the skin morphological characteristics by Reflectance Confocal Microscopy.

## Materials and methods

### *Study Design*

After approval by Ethics Committee of Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo (CEP/FCFRP nº339), six female subjects, aged 40-55 years (mean age  $48 \pm$  SD: 4.95 years), skin Fitzpatrick Phototypes II and III, Caucasian descent were enrolled. (mean age:  $48.09 \pm$  SD: 4.85 years)

A cosmetic formulation based on hydroxyethylcellulose (1.8%), methylphenyl polysiloxane (2.0%), cyclomethicone (1.5%), cyclomethicone and crosspolymer dimethicone (1.5%), hydrosoluble filter UVA/UVB (7.5%), propylene glycol (2.5%), glycerin, 2-Phenoxyethanol (And) Methylisothiazolinone (0.8%), (And) Aqua/Water was added to 4% of the di- and tripeptides of hydrolyzed rice protein and applied on the face twice a day by subjects for a 90 day period. Instrumental measurements by RCM were performed before (baseline) and after 90 days of the application of studied formulation in the periorbital region of the face. The subjects were required to remain in the laboratory [located in the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil ( $21^{\circ}100$  S,  $47^{\circ}480$  W)] with controlled climatic conditions of  $21.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$  and  $50 \pm 5\%$  of relative humidity for 20 minutes before the beginning of the measurements.

da pele em tempo real. É uma técnica amplamente utilizada em dermatologia e pode ser aplicada na área cosmética para caracterizar diferentes tipos de pele e avaliar a eficácia dos cosméticos sem a necessidade de biópsias (12, 13).

Neste contexto, a aplicação de MCR para avaliar a eficácia clínica de formulações cosméticas traz uma importante contribuição para elucidar os reais benefícios da aplicação dessas formulações para o tratamento da pele fotoenvelhecida.

Assim, o objectivo deste estudo foi avaliar a influência da aplicação de uma formulação cosmética contendo di- e tripeptídeos de proteína de arroz hidrolisado nas características morfológicas da pele por Microscopia Confocal de Reflectância.

## Material e métodos

### *Desenho do estudo*

Após aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP nº339), seis participantes de pesquisa do sexo feminino, com idades entre os 40-55 anos (média  $48 \pm$  DP: 4.95 anos), pele com fototipo de Fitzpatrick II e III, caucasiano descendente foram recrutados. Uma formulação dermocosmética à base de hydroxyethylcellulose (1,8%), methylphenyl polysiloxane (2,0%), cyclomethicone (1,5%), cyclomethicone and crosspolymer dimethicone (1,5%), hydrosoluble filter UVA/UVB (7,5%), propylene glycol (2,5%), glycerin (2,5%), 2-Phenoxyethanol (e) Methylisothiazolinone (0,8%) (e) Aqua/Water foi adicionada de 4% do di- e tripeptídeos de proteína de arroz hidrolisado e aplicada no rosto duas vezes por dia por indivíduos durante um período de 90 dias. Foram realizadas medições instrumentais MCR antes (basal) e após 90 dias da aplicação da formulação estudada na região periorbital do rosto. As participantes de pesquisa tiveram de permanecer no laboratório [localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil ( $21^{\circ}100$  S,  $47^{\circ}480$  W)] com condições climáticas controladas de  $21,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $50 \pm 5\%$  de humidade relativa durante 20 minutos antes do início das medições.

**Table 1 - Reflectance Confocal Microscopy parameters to assess the epidermis thickness. /  
 Tabela 1 - Parâmetros Microscopia Confocal de Reflectância para avaliar a espessura da epiderme.**

RCM parameters / Parâmetros MCR	Description / Descrição
Stratum Corneum Thickness / Espessura do estrato córneo	Distance between the beginning of the stratum corneum and the beginning of the stratum granulosum / Distância entre o início do estrato córneo e o início da camada granulosa
Granular Layer Thickness / Espessura da camada granular	Distance between the beginning of the stratum granulosum and the beginning of the stratum spinosum / Distância entre o início da camada granulosa e o início da camada espinhosa
Dermal Papillae Depth / Profundidade da papilla dérmica	Beginning to the end of the dermal papillae / Distância do início e o fim da papilla dérmica
Minimum Epidermis Thickness / Espessura mínima da epiderme	Distance between the end of the stratum corneum and the beginning of the dermal papillae / Distância entre o fim estrato córneo e o início das papilas dérmicas
Maximum Epidermis Thickness / Espessura máxima da epiderme	Distance between the end of the stratum corneum and the end of the dermal papillae / Distância entre o fim do estrato córneo e o fim das papilas dérmicas
Mean Epidermis Thickness / Espessura média da epiderme	Sum of minimum and maximum thickness divided by 2 / Soma da espessura mínima e máxima dividida por 2
Total Epidermis Thickness / Espessura total da epiderme	Distance between the beginning of the stratum corneum and the end of the dermal papillae / Distância entre o início do estrato córneo e o fim das papilas dérmicas

### *Skin imaging technique - RCM*

Reflectance Confocal Microscopy (VivaScope® 1500, Lucid, New York, USA) emits a low-powered laser (22 mW) with a wavelength close to the infrared (830 nm). This equipment obtains several microscopic images captured as horizontal sections with a field of view of 500 x 500 µm and a high-resolution of 1000 x 1000 pixels. The VivaStack® program allows the capture of images in depth from the stratum corneum to the papillary dermis. The depth of the layers, dermal papillae depth and epidermis thickness is calculated with the “z-depth” (Table 1). Analyzes of interkeratinocyte brightness, furrows morphology and skin surface homogeneity were performed using a standardized score in our NEATEC (Center of Advanced Studies in Cosmetic Technology) research group (14).

In addition, other scores adapted from Longo et al. (2013) were assessed as honeycomb pattern, skin hyperpigmentation, dermal papillae morphology, dermis morphology (15). The score definitions are shown in Table 2.

### *Statistical analysis*

The normal distribution of the data was evaluated by the Shapiro-Wilk test in the OriginPro® 8 software. After defining whether the data were parametric or non-parametric, the paired Student's t or Wilcoxon tests were performed, respectively. GraphPad Prism® 5 software was used to perform the statistical analyses. The value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### *Técnica de imagem da pele - MCR*

Microscopia Confocal Reflectância (VivaScope® 1500, Lucid, New York, USA) emite um laser de baixa potência (22 mW) com um comprimento de onda próximo do infravermelho (830 nm). Este equipamento obtém várias imagens microscópicas captadas como seções horizontais com um campo de visão de 500 x 500 µm e uma alta resolução de 1000 x 1000 pixels. O programa VivaStack® permite captar imagens em profundidade desde o estrato córneo até à derme papilar. A profundidade das camadas, profundidade das papilas dérmicas e espessura da epiderme é calculada com a "profundidade z" (Tabela 1). A análise do brilho dos interqueratinócitos, da morfologia dos sulcos e da homogeneidade da superfície da pele foi realizada utilizando um escore padronizado no nosso grupo de investigação NEATEC (Núcleo de Estudos Avançados em Tecnologia de Cosméticos)(14).

Além disso, outros escores adaptados de Longo et al. (2013) foram avaliadas como padrão favo de mel, hiperpigmentação da pele, morfologia das papilas dérmicas, morfologia da derme (15). As definições das pontuações foram demonstradas na Tabela 2.

### *Análise estatística*

A distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk no software OriginPro® 8. Após definir se os dados são paramétricos ou não paramétricos, foram realizados os testes t de Student pareado ou Wilcoxon, respectivamente. O software GraphPad Prism® 5 foi utilizado para realizar as análises estatísticas. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

**Table 2 - Reflectance Confocal Microscopy Scores to assess the photoaged skin. /  
Tabela 2 - Escores da Microscopia Confocal de Reflectância para avaliar a pele fotoenvelhecida.**

<b>RCM Scores / Escore da MCR</b>	<b>Description / Descrição</b>
Skin Surface Homogeneity / Homogeneidade da superfície da pele	Score from 0 to 3, being regular (Score 0) and irregular skin surface (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo regular (Escore 0) e irregular na superfície da pele (Escore 3).
Furrows Morphology / Morfologia dos sulcos	Score from 0 to 3, being regular (Score 0) and irregular furrows morphology (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo a morfologia de sulcos regular (Escore 0) e irregulares (Escore 3).
Interkeratinocyte Brightness / Brilho dos interqueratinócitos	Score from 0 to 3, being low (Score 0) and high interkeratinocyte brightness (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo o brilho dos interqueratinócitos baixo (Escore 0) e alta (Escore 3).
Honeycomb Pattern / Padrão do favo de mel	Score from 0 to 3, being well defined (Score 0) and undefined honeycomb pattern (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo o padrão favo de mel bem definido (Escore 0) e indefinido (Escore 3).
Skin Hyperpigmentation / Hiperpigmentação da pele	Score from 0 to 3, being low (Score 0) and high skin hyperpigmentation (Score 3) / Escore de 0 a 3, sendo a hiperpigmentação da pele baixa (Escore 0) e alta (Escore 3).
Dermal Papillae Morphology / Morfologia das papilas dérmicas	Score from 1 to 5, being round and well-outlined rings contours (Score 1), round and partially outlined rings contours (Score 2), well-outlined contours of polycyclic papillae (Score 3), partially outlined contours of polycyclic papillae (Score 4) and dermal papillae effacement (Score 5) / Escore de 1 a 5, sendo os contornos das papilas dérmicas redondas e bem delineados (Escore 1), contornos das papilas dérmicas redondas e parcialmente delineadas (Escore 2), contornos bem delineados de papilas policíclicas (Escore 3), contornos parcialmente delineados de papilas policíclicas (Escore 4) e achatamento de papilas dérmicas (Escore 5).
Dermis Morphology / Morfologia da derme	Score from 1 to 5, being presence of thin collagen (Score 1), thin and coarse collagens (Score 2), coarse collagen (Score 3), coarse and huddled collagens (Score 4) and huddled collagen (Score 5) / Escore de 1 a 5, sendo presença de colágeno fino (Escore 1), colágeno fino e grosso (Escore 2), colágeno grosso (Escore 3), colágeno grosso e amontoado (Escore 4) e colágeno amontoado (Escore 5).

## Results

The results showed a significant increase ( $p=0.0328$ ) of dermal papillae depth after the use of studied formulation for 90 days. In addition, an increase in the total epidermis thickness was observed after the 90 day period, which is according to improvement of dermal papillae depth (Table 3).

The results of RCM score analyses are shown in Figures 1 to 7.

The skin surface homogeneity score analysis showed an improvement of skin regularity of stratum corneum since the participants with Score 1 increased after 90 days of treatment (Figure 1A). This improvement can be seen in representative RCM images (Figure 1B).

The furrows morphology score improved after the 90 day formulation application period as the Score 0 (regular) increased (Figure 2A). Representative RCM images showed an improvement in the furrow morphology noted as straighter edges of the furrows relative to the baseline (Figure 2B).

## Resultados

Os resultados mostraram um aumento significativo ( $p=0,0328$ ) da profundidade das papilas dérmicas após a utilização durante 90 dias da formulação estudada. Além disso, observou-se um aumento da espessura total da epiderme após o período de 90 dias, o que está de acordo com a melhora da profundidade das papilas dérmicas (Tabela 3).

Os resultados da análise por escore das imagens do MCR estão apresentados nas Figuras 1 a 7.

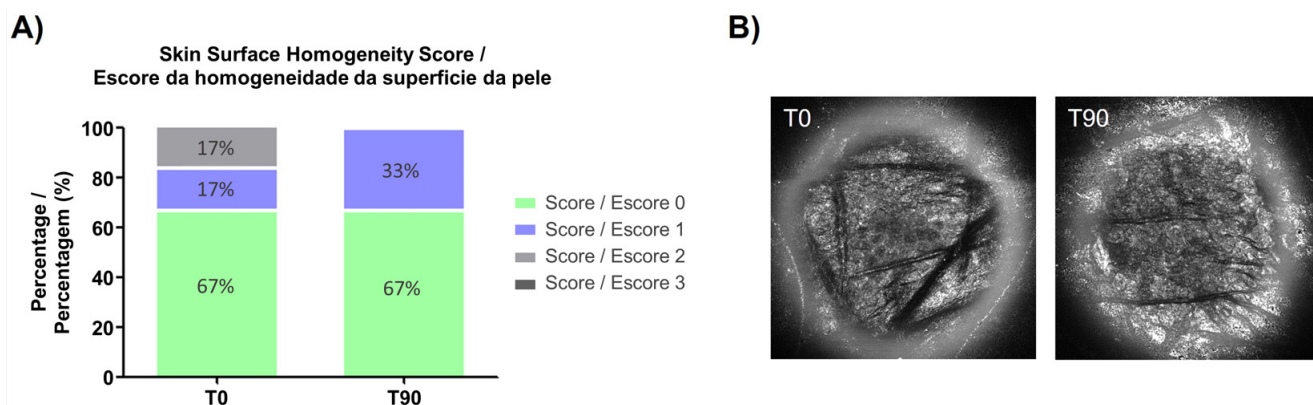
A análise por escore de homogeneidade da superfície da pele mostrou uma melhora da regularidade da pele do estrato córneo, uma vez que a Escore 1 aumentou após 90 dias de tratamento (Figura 1A). Esta melhora pode ser vista nas imagens representativas da MCR na Figura 1B.

O escore da morfologia dos sulcos melhorou, uma vez que a Escore 0 (regular) aumentou após a utilização durante 90 dias da formulação (Figura 2A). As imagens representativas da MCR mostraram uma melhora na morfologia dos sulcos uma vez que as bordas dos sulcos são mais retas do que no tempo inicial (Figura 2B).

**Table 3** - Reflectance Confocal Microscopy parameters of epidermis thickness. /  
**Tabela 3** - Parâmetros Microscopia Confocal de Reflectância da espessura da epiderme.

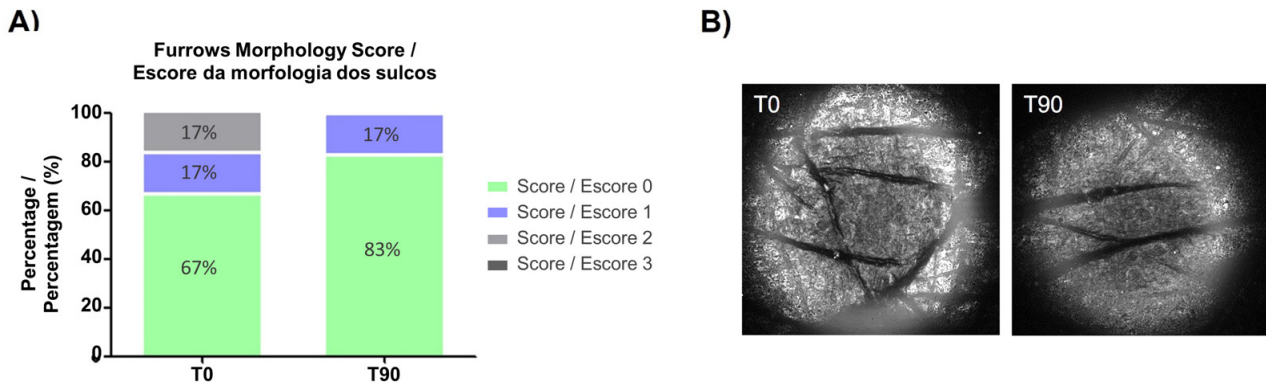
( $\mu\text{m}$ )	T0	T90	P value/ Valor de P
Stratum Corneum Thickness / Espessura do estrato córneo	11.806 $\pm$ 4.183	11.472 $\pm$ 1.916	0.8438
Granular Layer Thickness / Espessura da camada granular	12.361 $\pm$ 4.606	10.778 $\pm$ 1.569	0.4712
Dermal Papillae Depth / Profundidade da papilla dérmica	12.917 $\pm$ 3.231	16.694 $\pm$ 4.385	0.0328*
Minimum Epidermis Thickness / Espessura mínima da epiderme	15.528 $\pm$ 4.970	17.972 $\pm$ 3.248	0.4533
Maximum Epidermis Thickness / Espessura máxima da epiderme	28.444 $\pm$ 6.695	34.667 $\pm$ 6.571	0.1519
Mean Epidermis Thickness / Espessura média da epiderme	21.986 $\pm$ 5.670	26.319 $\pm$ 4.696	0.2641
Total Epidermis Thickness / Espessura total da epiderme	40.250 $\pm$ 6.487	46.139 $\pm$ 7.177	0.2281

**Legend:** RCM results were demonstrated as mean  $\pm$  standard deviation. \*: significant difference between times /  
**Legenda:** Os resultados da MCR foram demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão. \*: diferença significativa entre os tempos.



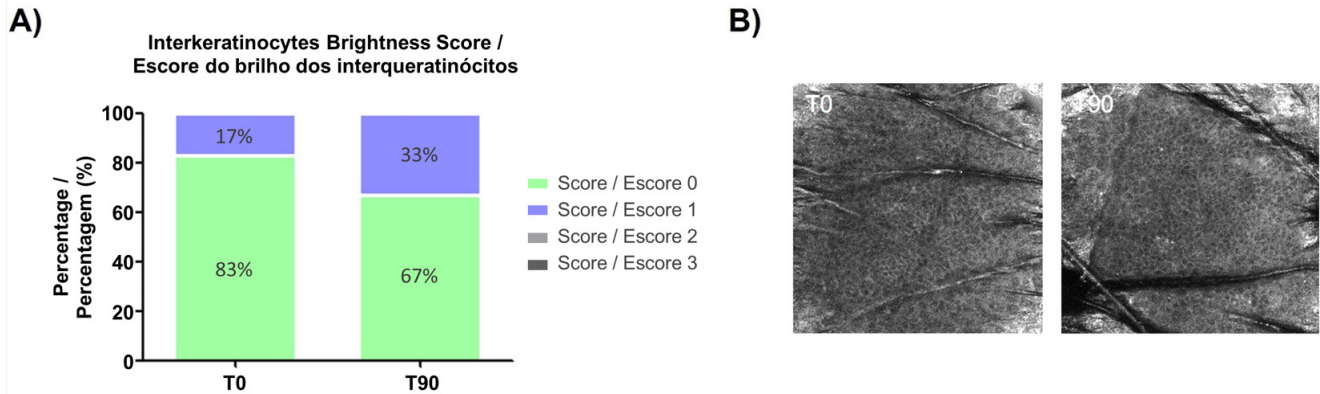
**Figure 1** - Skin surface homogeneity score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of stratum corneum of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with skin surface irregularity and after treatment (T90) with regular skin surface homogeneity. (Scale: 500 x 500  $\mu\text{m}$ )

**Figura 1** - Escore da homogeneidade da superfície da pele (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR do estrato córneo da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com irregularidade da superfície da pele e após o tratamento (T90) com homogeneidade regular da superfície da pele. (Escala: 500 x 500  $\mu\text{m}$ )



**Figure 2** - Furrows morphology score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of stratum corneum of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with an irregularity furrows morphology and after treatment (T90) with regular furrows morphology. (Scale: 500 x 500  $\mu$ m)

**Figura 2** - Escore da morfologia dos sulcos (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR do estrato córneo da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com uma morfologia de sulcos de irregularidade e depois do tratamento (T90) com morfologia de sulcos regulares. (Escala: 500 x 500  $\mu$ m)



**Figure 3** - Interkeratinocyte brightness score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of granular layer of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of low interkeratinocyte brightness and after treatment (T90) with an interkeratinocyte brightness. (Scale: 500 x 500  $\mu$ m) /

**Figura 3** - Escore do brilho dos interqueratinócitos (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da camada granular da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com a presença de baixo brilho interqueratinócito e após tratamento (T90) com um brilho interqueratinócito. (Escala: 500 x 500  $\mu$ m)

The interkeratinocyte brightness score analysis showed an increase after 90 days of treatment with the studied formulation. The score represents the low interkeratinocyte brightness (Figure 3A). An increase of interkeratinocyte brightness in the granular layer is demonstrated in representative RCM images after 90 days of treatment (Figure 3B).

The score analysis of the honeycomb pattern showed better homogeneity of keratinocytes with a more defined honeycomb pattern, as a Score 1 was found in 100% of the subjects after 90 days of treatment with the formulation (Figure 4A). The improvement in the honeycomb pattern is observed in representative RCM images (Figure 4B) in which the keratinocytes are homogeneous in size and shape and with defined cell borders after the treatment period.

The score analysis of the skin hyperpigmentation showed a reduction after the use of the formulation under study for 90 days, with an increase in participants with Score 1 (Figure 5A). The basal layer observed in the representative RCM images (Figure 5B) shows a reduction of basal layer brightness after 90 days of treatment.

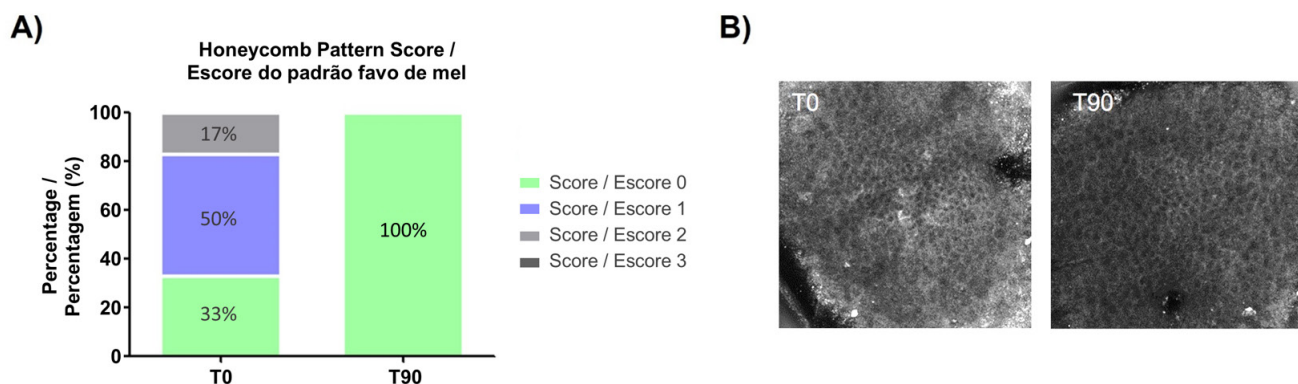
The score analysis of the dermal papillae morphology showed an improvement after the use of the formulation as Score 2 was observed in 100% of participants after

A análise por escore do brilho dos interqueratinócitos mostrou um aumento após 90 dias de tratamento com a formulação em estudo. Além disso, o Escore 0 representa a baixa reflectância interqueratinócitos (Figura 3A). A camada granulosa com um aumento do brilho dos interqueratinócitos está demonstrada em imagens representativas da MCR após 90 dias de tratamento (Figura 3B).

A análise por escore do padrão do favo de mel mostrou melhora da homogeneidade dos queratinócitos e padrão favo de mel mais definido, uma vez que 100% do Escore 1 foi encontrada nas participantes de pesquisa após 90 dias de tratamento com a formulação (Figura 4A). A melhora do padrão do favo de mel foi observada em imagens representativas da MCR (Figura 4B) em que os queratinócitos estão homogêneos em tamanho e forma e com limites celulares definidos após o período de tratamento.

A análise por escore de hiperpigmentação da pele mostrou uma redução após a utilização durante 90 dias da formulação em estudo, uma vez que o Escore 1 aumentou após 90 dias de tratamento (Figura 5A). As imagens representativas da MCR (Figura 5B) mostram uma redução do brilho da camada basal após 90 dias de tratamento.

A análise por escore da morfologia das papilas dérmicas mostrou uma melhora após a utilização durante 90 dias da formulação, uma vez que o Escore 2 foi observada



**Figure 4 -** Honeycomb pattern score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of granular layer of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of irregular honeycomb pattern and after treatment (T90) with more defined honeycomb pattern. (Scale: 500 x 500 µm)/

**Figura 4 -** Escore do padrão do favo de mel (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da camada granular da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com a presença de padrão de favo de mel irregular e depois tratamento (T90) com padrão favo de mel mais definido. (Escala: 500 x 500 µm)

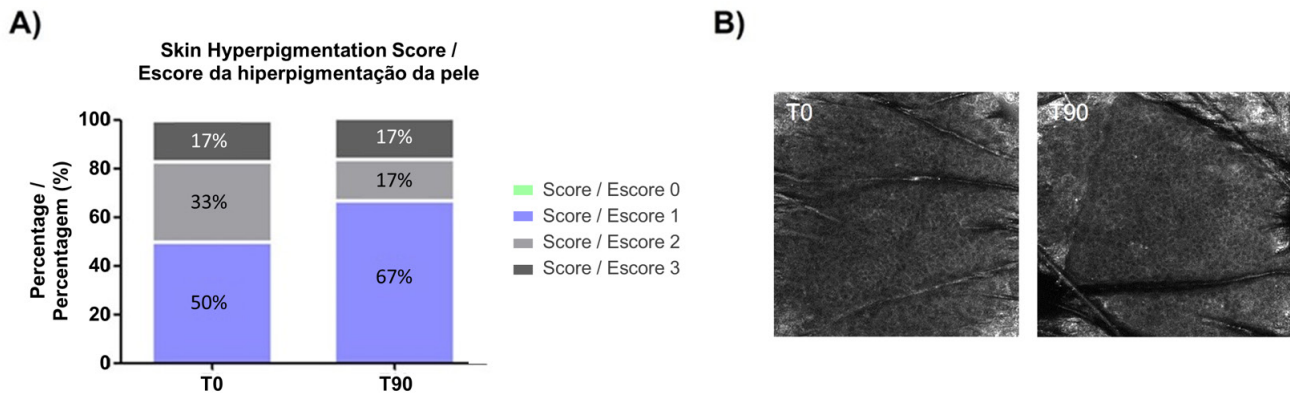


90 days of treatment (Figure 6A). Representative RCM images showed an improvement in the dermal papillae morphology after 90 days of treatment, in which the dermal papillae were rounded and partially outlined rings contours instead of polycyclic papillae (Figure 6B).

The score analysis of the dermis morphology showed an improvement of collagen after the use of the studied formulation for 90 days. The presence of coarse collagen

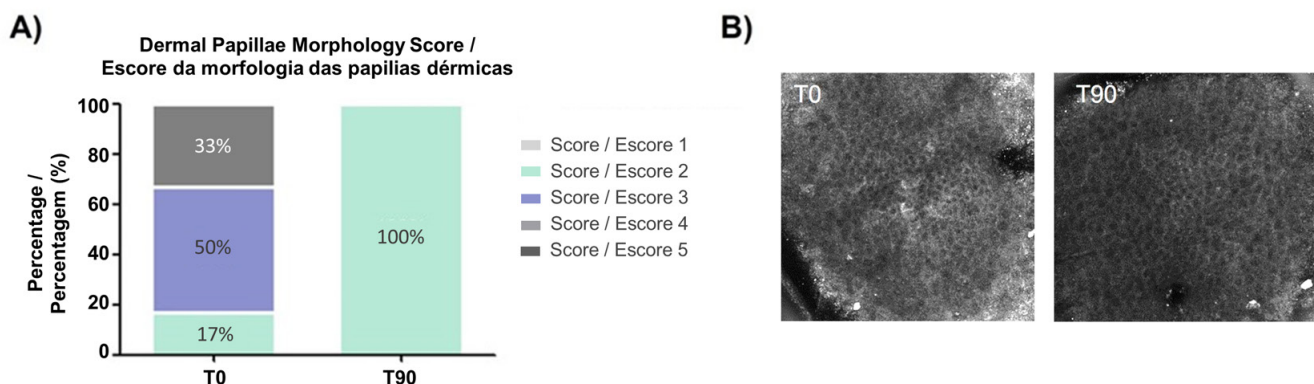
em 100% das participantes de pesquisa após 90 dias de tratamento (Figura 6A). Imagens representativas da MCR mostraram uma melhora na morfologia das papilas dérmicas após 90 dias de tratamento, uma vez que as papilas dérmicas estão arredondadas e parcialmente delineadas em anéis em vez de papilas policíclicas (Figura 6B).

O escore da análise da morfologia da derme mostrou melhora na morfologia do colágeno após a aplicação



**Figure 5** - Skin hyperpigmentation score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of basal layer of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of basal layer brightness and after treatment (T90) with the basal layer brightness reduction. (Scale: 500 x 500 µm) /

**Figura 5** - Escore da hiperpigmentação da pele (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da camada basal da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com a presença de brilho da camada basal e depois tratamento (T90) com a redução do brilho da camada basal. (Escala: 500 x 500 µm).



**Figure 6** - Dermal papillae morphology score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of dermal epidermal junction of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of poorly-defined polycyclic papillae and after treatment (T90) with the presence of round and poorly-defined papillae. (Scale: 500 x 500 µm) /

**Figura 6** - Escore da morfologia das papilas dérmicas (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da junção epidérmica dérmica da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes do tratamento (T0) com a presença de papilas policíclicas mal definidas e após tratamento (T90) com a presença de papilas redondas e mal definidas. (Escala: 500 x 500 µm)

(Score 3) was presented in 50% of participants after 90 days of treatment (Figure 7A). The dermis morphology was represented as coarse and huddled collagen at the initial time and was observed as coarse collagen after the treatment period (Figure 7B).

## Discussion

In order to prove the effectiveness of the topical peptides, clinical study is important for the development of effective and innovative cosmetic formulations (16). For that, the RCM imaging analysis is essential to evaluate the effects of the active ingredients in skin depth as it evaluates the morphological and structural characteristics of the epidermis in real time and in a non-invasive way (12).

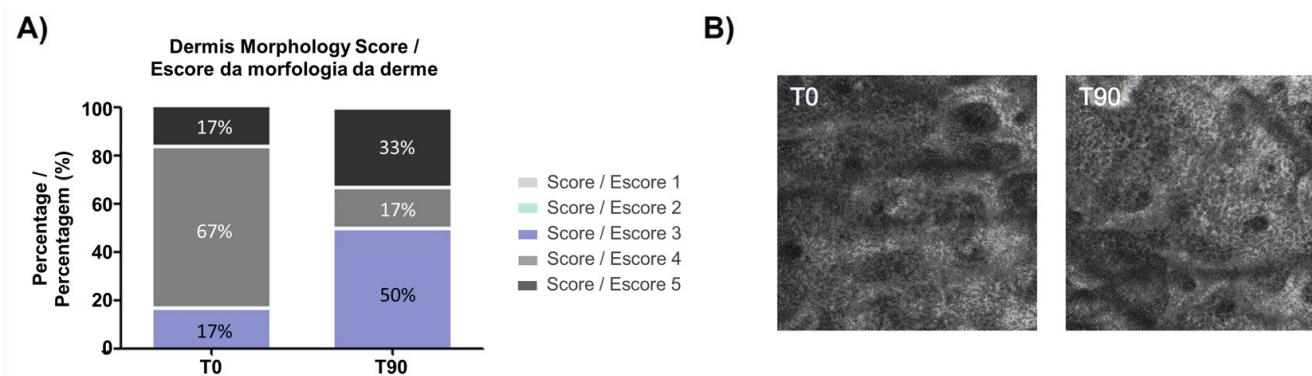
According to the results obtained, improvements of regularity of stratum corneum, furrow morphology and increase of interkeratinocyte brightness were observed after the use of the formulation under study for 90 days. These findings corroborated with the study of Manfredini et al. (2013) that suggested an increase of skin hydration due to a decrease in the irregularity of the skin surface, an improvement in the morphology of furrows and an increase in the interkeratinocytes brightness after application of the cosmetic formulations (17). In addition, Shirata and Maia Campos (2021)

durante 90 dias da formulação estudada. A presença de colágeno grosso (Escore 3) foi apresentada em 50% dos indivíduos após 90 dias de tratamento (Figura 7A). A morfologia da derme foi representada como colágeno grosso e amontoadado no momento inicial e foi observado como colágeno grosso após o período de tratamento (Figura 7B).

## Discussão

A fim de provar a eficácia dos peptídeos tópicos, o estudo clínico é importante para o desenvolvimento de formulações cosméticas eficazes e inovadoras (16). Para isso, a análise de imagem da MCR é essencial para avaliar os efeitos dos ingredientes ativos na profundidade da pele, uma vez que avalia as características morfológicas e estruturais da epiderme em tempo real e de uma forma não invasiva (12).

De acordo com os resultados obtidos, foram observadas melhorias da regularidade do estrato córneo, da morfologia do sulco e do aumento do brilho dos interqueratinócitos após a utilização durante 90 dias da formulação em estudo. Estes resultados corroboraram com o estudo de Manfredini et al. (2013) que sugeriu um aumento da hidratação da pele devido a uma diminuição da irregularidade da superfície da pele, uma melhora da morfologia dos sulcos e um aumento do brilho dos



**Figure 7** - Dermis morphology score (A) demonstrated in relative frequency (%) before (baseline – T0) and after 90 days of treatment; (B) Representative RCM images of dermis of the periorbital region of the subjects' face before treatment (T0) with the presence of coarse and huddled collagen and after treatment (T90) with the presence of coarse collagen. (Scale: 500 x 500  $\mu$ m) /

**Figura 7** - Escore da morfologia da derme (A) demonstrada em frequência relativa (%) antes (tempo inicial - T0) e após 90 dias de tratamento; (B) Imagens representativas da MCR da derme da região periorbital do rosto das participantes de pesquisa antes tratamento (T0) com a presença de colágeno grosso e amontoadado e após tratamento (T90) com a presença de colágeno grosso. (Escala: 500 x 500  $\mu$ m)

showed a significant increase in the granular layer thickness in photoaged skin after a 90 day application period of a formulation containing di- and tri peptides, which suggest an increase of skin hydration (11).

Moreover, the improvement in the honeycomb pattern suggests an improvement in the skin conditions, since the irregularity of the honeycomb pattern is present in skin photoaging (7,18).

A significant increase of dermal papillae depth and the improvement of dermal papillae morphology after 90 days of treatment with the formulation under study suggests that the formulation was effective for the treatment of alterations in the aged skin since the improvement in the dermo-epidermal junction can increase the skin nutrition and basal cell proliferation that are compromised with skin aging (5).

Another finding that suggests the efficacy of the studied formulation on aged skin was the improvement of the collagen morphology, since there was a decrease of huddled collagen and increase of coarse collagen after the use of the proposed formulation for 90 days (15).

These findings are very important since the aging process cause changes in the layers of dermis, superficial papillary layer and deeper reticular layer, which have distinct collagen fibrils and fibroblast properties (19). However, the papillary layer shows more remarkable changes with aging than the reticular layer (20).

In addition, there was a reduction of skin hyperpigmentation after the use of the proposed formulation for 90 days, which can suggest that there was an improvement in the photoaged skin, since hyperpigmentation is present on skin exposed to higher incidence of UV radiation (18). This result corroborate with the findings reported by Shirata e Maia Campos (2021), who observed a significant hyperpigmentation reduction after a 90 day period of use of the cosmetic formulations based on rice peptides in combination with ascorbyl tetraisopalmitate (11).

In addition, the oral and topical use of peptides is commonly used in dermatology for skin care (21). Oral collagen supplements are known to increase skin elasticity, hydration and dermal collagen density (22, 23). In addition, previous studies by our research

interqueratinócitos após a aplicação das formulações cosméticas (17). Além disso, Shirata e Maia Campos (2021) mostraram um aumento significativo na espessura da camada granular após um período de 90 dias de aplicação de uma formulação adicionada a di e tri peptídeos na pele fotoenvelhecida, o que sugere um aumento da hidratação da pele (11).

Além disso, a melhora do padrão do favo de mel sugere uma melhora das condições cutâneas, uma vez que a irregularidade do padrão do favo de mel está presente no fotoenvelhecimento cutâneo (7,18).

Um aumento significativo da profundidade das papilas dérmicas e a melhora da morfologia das papilas dérmicas após 90 dias de tratamento com a formulação em estudo sugere que a formulação foi eficaz para o tratamento de alterações na pele envelhecida, uma vez que a melhora da junção dermo-epidérmica pode aumentar a nutrição da pele e a proliferação de células basais que estão comprometidas com o envelhecimento da pele (5).

Outra descoberta que sugere a eficácia da formulação estudada na pele envelhecida foi a melhora da morfologia do colágeno, uma vez que houve uma diminuição do colágeno amontoado e um aumento do colágeno grosso após a utilização durante 90 dias da formulação proposta. (15).

Estas descobertas são muito importantes uma vez que o processo de envelhecimento provoca alterações nas camadas da derme, camada papilar superficial e camada reticular mais profunda, que têm fibras de colágeno e propriedades fibroblásticas distintas (19). No entanto, a camada papilar mostra alterações mais notáveis com o envelhecimento do que a camada reticular (20).

Além disso, houve uma redução da hiperpigmentação da pele após a utilização durante 90 dias da formulação proposta, o que pode sugerir que houve uma melhora na pele fotoenvelhecida, uma vez que a hiperpigmentação está presente na pele exposta a maior incidência de radiação UV (18). Este resultado corrobora com os resultados relatados por Shirata e Maia Campos (2021), que observou uma redução significativa da hiperpigmentação após um período de 90 dias de utilização das formulações cosméticas baseadas em peptídeos de arroz em combinação com o ascorbil tetraisopalmitato (11).

Além disso, a utilização oral e tópica de peptídeos é comumente utilizada em dermatologia para os

group have shown a significant increase in dermis echogenicity, hydration and viscoelastic properties of the skin after using formulations containing di- and tripeptides extracted from rice for 90 days of topical or oral treatment (10).

In summary, the present study complements the previous study of our research group since it showed that the proposed cosmetic formulation was effective in the improvement of honeycomb pattern of epidermis, dermoepidermal junction and dermis morphology due to an improvement of collagen morphology after a 90 day period of application.

Finally, the study has as limitations the lack of a control group and the small number of participants in the clinical study.

## **Conclusion**

The results obtained in RCM imaging analyses showed an improvement of morphological characteristics of the skin after 90 days of twice-daily application of the studied cosmetic formulation containing di- and tripeptides extracted from rice when compared to baseline - initial time, before the formulation application, as it improved epidermis and dermoepidermal junction (DEJ) morphology.

Reflectance Confocal Microscopy can be suggested as a valuable tool for evaluating the effectiveness of cosmetic formulations on the skin, in an objective and non-invasive way under the real conditions of use.

cuidados da pele (21). Sabe-se que os suplementos orais de colágeno aumentam a elasticidade da pele, a hidratação e a densidade de colagénio dérmico (22, 23). Além disso, estudos anteriores do nosso grupo de investigação demonstraram um aumento significativo da ecogenicidade da derme, hidratação e propriedades viscoelásticas da pele após a utilização de formulações adicionadas com di- e tripeptídeos extraídos do arroz durante 90 dias de tratamento tópico ou oral (10).

Em síntese, o presente estudo complementa o estudo anterior do nosso grupo de investigação, uma vez que mostrou a formulação cosmética proposta foi eficaz na melhoria da homogeneidade dos queratinócitos - padrão do favo de mel da epiderme, da morfologia da junção dermoepidérmica e da derme devido a uma melhora da morfologia do colágeno após um período de 90 dias de aplicação.

Por fim, o estudo apresenta como limitação a falta de um grupo controle e um número pequeno de participantes do estudo clínico.

## **Conclusão**

Os resultados obtidos nas análises de imagem obtidas do MCR mostraram uma melhoria das características morfológicas da pele após 90 dias de aplicação duas vezes por dia da formulação cosmética estudada contendo di- e tripeptídeos extraídos do arroz em comparação com o basal - tempo inicial - antes da aplicar a formulação, uma vez que melhorou a morfologia das epiderme, papilas dérmicas e junção dermoepidérmica (JDE).

A Microscopia Confocal Reflectância pode ser sugerida como uma ferramenta valiosa para avaliar a eficácia de formulação cosméticas na pele, de forma objectiva e não invasiva sob as condições reais de utilização.

## **Acknowledgement**

The authors would like to express their thanks for the financial support of the Fundação de Amparo à do Estado de Sao Paulo - Brasil – FAPESP (grant number 2017/19278-0) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

## **Authors Contributions**

The contributions of Patrícia M. B. G. Maia Campos were conceptualization of the study, writing, revision, and editing. The contributions of Gabriela M. D'Angelo Costa were data and image analysis, statistical analysis and writing.

## **Conflicts of Interest**

The Editor involved in the authorship of this manuscript 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.

## **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil - FAPESP (subvenção número 2017/19278-0) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

## **Declaração sobre as contribuições do autor**

As contribuições de Patrícia M. B. G. Maia Campos foram conceptualização do estudo, redacção, revisão e edição. As contribuições de Gabriela M. D'Angelo Costa foram análise de dados e imagem, análise estatística e escrita.

## **Conflito de Interesses**

A Editora presente na autoria deste manuscrito não participou nos processos de pessoais revisão e/ou decisão. As autoras declararam não possuir quaisquer relações financeiras ou que possam configurar um potencial conflitos de interesse.

## References / Referências

1. Lee C. M. (2016). Fifty years of research and development of cosmeceuticals: a contemporary review. *Journal of cosmetic dermatology*, 15(4), 527–539. <https://doi.org/10.1111/jocd.12261>
2. Verschoore, M., & Nielson, M. (2017). The Rationale of Anti-Aging Cosmetic Ingredients. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, 16(6), s94–s97.
3. Campos, P. M., Gianeti, M. D., Mercurio, D. G., & Gaspar, L. R. (2014). Synergistic effects of green tea and ginkgo biloba extracts on the improvement of skin barrier function and elasticity. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, 13(9), 1092–1097.
4. Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International journal of cosmetic science*, 30(2), 87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00415.x>
5. Zhang, S., & Duan, E. (2018). Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell transplantation*, 27(5), 729–738. <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>
6. Khavkin, J., & Ellis, D. A. (2011). Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 19(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>
7. Mercurio, D. G., Jdid, R., Morizot, F., Masson, P., & Maia Campos, P. M. (2016). Morphological, structural and biophysical properties of French and Brazilian photoaged skin. *The British journal of dermatology*, 174(3), 553–561. <https://doi.org/10.1111/bjd.14280>
8. Infante, V. H. P., Bagatin, E., & Maia Campos, P. M. B. G. (2021). Skin photoaging in young men: A clinical study by skin imaging techniques. *International journal of cosmetic science*, 43(3), 341–351. <https://doi.org/10.1111/ics.12701>
9. Zhang, L., & Falla, T. J. (2009). Cosmeceuticals and peptides. *Clinics in dermatology*, 27(5), 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.05.013>
10. Maia Campos, P. M. B. G., Melo, M. O., & Siqueira César, F. C. (2019). Topical application and oral supplementation of peptides in the improvement of skin viscoelasticity and density. *Journal of cosmetic dermatology*, 18(6), 1693–1699. <https://doi.org/10.1111/jocd.12893>
11. Fossa Shirata, M. M., & Maia Campos, P. M. B. G. (2021). Sunscreens and Cosmetic Formulations Containing Ascorbyl Tetraisopalmitate and Rice Peptides for the Improvement of Skin Photoaging: A Double-blind, Randomized Placebo-controlled Clinical Study. *Photochemistry and photobiology*, 97(4), 805–815. <https://doi.org/10.1111/php.13390>
12. Maia Campos, P.M.B.G., Melo, M.O. & Mercurio, D.G. (2016). Assessment of skin photoaging with reflectance confocal microscopy. In M.C.A Issa & B. Tamura (Eds.), *Daily Routine in Cosmetic Dermatology, Clinical Approaches and Procedures in Cosmetic Dermatology* (pp. 1-10). Springer International Publishing AG, Cham.
13. Calzavara-Pinton, P., Longo, C., Venturini, M., Sala, R., & Pellacani, G. (2008). Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochemistry and photobiology*, 84(6), 1421–1430. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00443.x>
14. Maia Campos, P.M.B.G. & Melo, M.O. (2018). Application of Reflectance Confocal Microscopy in the evaluation of skin hydration. *ISBS World Congress 2018*, San Diego, USA.
15. Longo, C., Casari, A., De Pace, B., Simonazzi, S., Mazzaglia, G., & Pellacani, G. (2013). Proposal for an in vivo histopathologic scoring system for skin aging by means of confocal microscopy. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 19(1), e167–e173. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2012.00623.x>
16. Espinosa-Leal, C. A., & Garcia-Lara, S. (2019). Current Methods for the Discovery of New Active Ingredients from Natural Products for Cosmeceutical Applications. *Planta medica*, 85(7), 535–551. <https://doi.org/10.1055/a-0857-6633>
17. Manfredini, M., Mazzaglia, G., Ciardo, S., Simonazzi, S., Farnetani, F., Longo, C., & Pellacani, G. (2013). Does skin hydration influence keratinocyte biology? In vivo evaluation of microscopic skin changes induced by moisturizers by means of reflectance confocal microscopy. *Skin research and technology: official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 19(3), 299–307. <https://doi.org/10.1111/srt.12042>
18. Wurm, E. M., Longo, C., Curchin, C., Soyer, H. P., Prow, T. W., & Pellacani, G. (2012). In vivo assessment of chronological ageing and photoageing in forearm skin using reflectance confocal microscopy. *The British journal of dermatology*, 167(2), 270–279. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10943.x>
19. Korosec, A., Frech, S., Gesslbauer, B., Vierhapper, M., Radtke, C., Petzelbauer, P., & Lichtenberger, B. M. (2019). Lineage Identity and Location within the Dermis Determine the Function of Papillary and Reticular Fibroblasts in Human Skin. *The Journal of investigative dermatology*, 139(2), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.07.033>
20. Mine, S., Fortunel, N. O., Pigeon, H., & Asselineau, D. (2008). Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS one*, 3(12), e4066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004066>
21. Gorouhi, F., & Maibach, H. I. (2009). Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International journal of cosmetic science*, 31(5), 327–345. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00490.x>
22. Choi, F. D., Sung, C. T., Juhasz, M. L., & Mesinkovsk, N. A. (2019). Oral Collagen Supplementation: A Systematic Review of Dermatological Applications. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, 18(1), 9–16.
23. Maia Campos, P. M. B. G., Franco, R. S. B., Kakuda, L., Cadioli, G. F., Costa, G. M. D., & Bouvret, E. (2021). Oral Supplementation with Hydrolyzed Fish Cartilage Improves the Morphological and Structural Characteristics of the Skin: A Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16), 4880. <https://doi.org/10.3390/molecules26164880>