

Protective and anti-inflammatory effects of a dermocosmetic formulation containing a combination of vitamins

Efeitos protetores e anti-inflamatórios de uma formulação dermocosmética contendo uma associação de vitaminas

Laura Noronha Favaro ¹ , Patrícia Maia Campos ¹  , Letícia Kakuda ¹ , & Luís Monteiro Rodrigues ² 

Keywords: D-pantenol, liposoluble vitamin C, dermocosmetics, skin barrier

Palavras-chave: D-pantenol, vitamina C lipossolúvel, dermocosméticos, barreira cutânea

To Cite:

Favaro, L. N. , Campos, P. M., Kakuda, L. & Monteiro Rodrigues, L. (2024) Protective and anti-inflammatory effects of a dermocosmetic formulation containing a combination of vitamins. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 21(1), 27-42.

 [10.19277/bbr.21.1.335](https://doi.org/10.19277/bbr.21.1.335)

1 - School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Avenida do Café, S/N, Ribeirão Preto - SP, 14040-903, Brasil

2- CBIOS - Research Center for Biosciences & Health Technologies, Lusófona University, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:
pmcampos@usp.br

Received / Recebido: 08/03/2024

Accepted / Aceite: 17/06/2024

Abstract

The exposome accelerates the skin aging process, highlighting the need to use cosmetics capable of repairing the damage and maintaining the skin's physiological conditions. Thus, the present study aims to evaluate the potential anti-inflammatory and protective action of a dermocosmetic formulation combination of vitamins. For this, a gel-cream formulation added or not with 3% of ascorbyl tetraisopalmitate and 1% of D-panthenol was developed. The stability and sensory properties of these formulations were evaluated. In addition, a short-term clinical efficacy study of the formulations was carried out for 7 days. After this period, measurements were taken in terms of transepidermal water loss and blood microcirculation by Laser Doppler at the initial time and after the application of methyl nicotinate. The results showed that the formulations remained stable during the study period and showed pseudoplastic non-Newtonian behavior. In addition, the association of vitamins was effective in the protection of the skin against the effects of methyl nicotinate by reducing blood microcirculation, which suggests that the active substances in combination can have an anti-inflammatory and protective action on the skin barrier function.

Resumo

O exposoma acelera o processo de envelhecimento cutâneo, evidenciando a necessidade do uso de cosméticos que sejam capazes de reparar o dano e manter as condições fisiológicas da pele. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a potencial ação antiinflamatória e protetora da barreira cutânea de uma formulação dermocosmética contendo um associação de vitaminas. Para tal, foi desenvolvida uma formulação de gel-creme acrescida ou não de 3% de tetraisopalmitato de ascorbila e 1% de D-pantenol. A estabilidade e propriedades sensoriais dessas formulações foram avaliadas. Além disso, foi realizado um estudo de eficácia clínica em curto prazo das formulações por 7 dias. Após esse período, medidas foram realizadas em relação à perda transepidérmica de água e microcirculação sanguínea por Laser Doppler no tempo inicial e após a aplicação do metilnicotinato. Os resultados mostraram que as formulações permaneceram estáveis no período de estudo e apresentaram comportamento não newtoniano pseudoplástico. Além disso, a associação das vitaminas foi eficaz na proteção da pele contra os efeitos do metilnicotinato por reduzir a microcirculação sanguínea, o que sugere que as substâncias ativas em associação, podem apresentar ação anti-inflamatória e protetora da função barreira da pele.

Introduction

The exposome refers to a complex set of internal and external factors that accelerate the skin aging process, such as ultraviolet radiation, pollution, exposure to chemical and biological agents, diet, and biopsychosocial factors (1-3). In this context, cosmetic products must be able to repair skin damage and balance the hydrolipidic mantle using active substances capable of acting on cell regeneration and retaining water to moisturize and maintain the natural conditions of the skin. Among the vitamins that have gained popularity in the cosmetic market, vitamin C and D-panthenol stand out.

Vitamin C plays a crucial role in cellular redox processes (4,5) and is essential for collagen synthesis in the skin (4,6), making it beneficial for addressing photoaged skin concerns (7-10). However, its application in cosmetic formulations poses challenges due to its inherent instability as a water-soluble and thermolabile molecule. Vitamin C is susceptible to degradation in solution, especially at alkaline pH levels, and is highly vulnerable to oxidation when exposed to elevated temperatures and light (6,11). To overcome these stability issues and ensure sustained positive effects on the skin, cosmetic formulations often use vitamin C derivatives such as ascorbyl tetraisopalmitate (6).

On the other hand, D-panthenol is known for its stability and ability to repair and moisturize the skin, which can promote accelerated cell regeneration due to its hygroscopic properties (12,13). This vitamin, when applied topically, is converted to pantothenic acid, a natural component of skin and hair (13).

However, the efficacy of the active substance can be compromised if it is incorporated into an unpleasant vehicle, even if the active substance demonstrates excellent performance on its own.

In this perspective, the careful selection of raw materials and active substances, combined with precise formulation techniques, are crucial parameters for formulators. Attention to detail is crucial not only for achieving a pleasing sensory experience but also for ensuring acceptance and adherence to the developed cosmetic products. For example, the rheological properties and texture profile of an emulsion depend on the composition of the formulation and the interplay between its continuous and dispersed phases (14,15).

Introdução

O exposoma refere-se a um conjunto complexo de fatores internos e externos que aceleram o processo de envelhecimento da pele, como radiação ultravioleta, poluição, exposição a agentes químicos e biológicos, dieta e fatores biopsicossociais (1-3). Neste contexto, os produtos cosméticos devem ser capazes de reparar danos na pele e equilibrar o manto hidrolipídico usando substâncias ativas capazes de agir na regeneração celular e reter água para hidratar e manter as condições naturais da pele. Entre as vitaminas que ganharam popularidade no mercado cosmético, destacam-se a vitamina C e o D-pantenol.

A vitamina C desempenha um papel crucial nos processos de oxirredução celulares (4,5) e é essencial para a síntese de colágeno na pele (4,6), tornando-a benéfica para lidar com preocupações relacionadas à fotoenvelhecimento da pele (7-10). No entanto, sua aplicação em formulações cosméticas apresenta desafios devido à sua instabilidade inerente como molécula hidrossolúvel e termolábil. A vitamina C é suscetível à degradação em solução, especialmente em níveis de pH alcalinos, e é altamente vulnerável à oxidação quando exposta a temperaturas elevadas e luz (6,11). Para superar esses problemas de estabilidade e garantir efeitos positivos sustentados na pele, formulações cosméticas frequentemente utilizam derivados de vitamina C, como o tetraisopalmitato de ascorbila (6).

Por outro lado, o D-pantenol é conhecido por sua estabilidade e capacidade de reparar e hidratar a pele, o que pode promover a regeneração celular acelerada devido às suas propriedades higroscópicas (12,13). Esta vitamina, quando aplicada topicamente, é convertida em ácido pantotênico, um componente natural da pele e cabelo (13).

No entanto, a eficácia da substância ativa pode ser comprometida se ela for incorporada a um veículo desagradável, mesmo que a substância ativa demonstre excelente desempenho por si só.

Nesta perspectiva, a seleção cuidadosa de matérias-primas e substâncias ativas, combinada com técnicas de formulação precisas, são parâmetros cruciais para os formuladores. A atenção aos detalhes é crucial não apenas para alcançar uma experiência sensorial agradável, mas também para garantir a aceitação e adesão aos produtos cosméticos desenvolvidos. Por exemplo, as propriedades reológicas e o perfil de

This analysis is a critical factor in assessing the physical stability of cosmetic formulations (16). They are versatile tools with broad applications in formulation development, physical stability studies, and sensory analysis, all aimed at promoting the acceptance and sustained use of cosmetics (14).

After evaluating the stability and physicochemical properties of formulations, it is necessary to assess their clinical efficacy in vivo to support their proposed claims. The use of biophysical techniques and skin image analysis has become increasingly important for non-invasive assessments of skin characteristics (17). These methods offer objective and real-time evaluations of the skin.

Methyl nicotinate (MN) is a useful tool in the clinical efficacy protocol for investigating the anti-inflammatory activity of cosmetic formulations and assessing skin damage. MN, which is derived from nicotinic acid, induces a transient localized inflammatory response by releasing prostaglandin D2 and activating cyclooxygenase (18,19).

In this context, the objective of this study was to develop and evaluate the efficacy of dermocosmetic formulations containing D-panthenol and ascorbyl tetraisopalmitate in reducing microinflammation and improving the skin barrier using biophysical techniques and skin image analysis.

Materials and methods

Development of formulations

A gel-cream formulation was developed as described in Table 1. The vehicle formulation was designated as F1, while the formulation containing the association of the active substances was designated as F2.

Stability study and visual evaluation of formulations

Preliminary centrifugation tests were conducted 24 hours after preparing the formulations. Subsequently, pH and organoleptic analysis, including color, odor, and phase separation, were

textura de uma emulsão dependem da composição da formulação e da interação entre suas fases contínua e dispersa (14,15).

Essa análise é um fator crítico na avaliação da estabilidade física de formulações cosméticas (16). Elas são ferramentas versáteis com amplas aplicações no desenvolvimento de formulação, estudos de estabilidade física e análise sensorial, todos com o objetivo de promover a aceitação e o uso contínuo de cosméticos (14).

Após avaliar a estabilidade e as propriedades físico-químicas das formulações, é necessário avaliar sua eficácia clínica in vivo para sustentar suas alegações propostas. O uso de técnicas biofísicas e análise de imagem da pele tornou-se cada vez mais importante para avaliações não invasivas das características da pele (17). Esses métodos oferecem avaliações objetivas e em tempo real da pele.

O metil nicotinato (MN) é uma ferramenta útil no protocolo de eficácia clínica para investigar a atividade anti-inflamatória de formulações cosméticas e avaliar danos na pele. O MN, derivado do ácido nicotínico, induz uma resposta inflamatória localizada transitória ao liberar prostaglandina D2 e ativar a ciclooxygenase (18,19).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar a eficácia de formulações dermocosméticas contendo D-pantenol e tetraisopalmitato de ascorbila na redução da microinflamação e melhoria da barreira cutânea usando técnicas biofísicas e análise de imagem da pele.

Material e métodos

Desenvolvimento das formulações

Foi desenvolvida uma formulação em gel-creme conforme descrito na Tabela 1. A formulação veículo foi designada como F1, enquanto a formulação contendo a associação das substâncias ativas foi designada como F2.

Estudo de estabilidade das formulações e avaliação visual

Foram realizados testes preliminares de centrifugação 24 horas após a preparação das formulações. Posteriormente, análises de pH e organolépticas, incluindo cor, odor e separação de fases, foram

Table 1 - Composition (w/w) of the developed formulations.**Tabela 1** - Composição (p/p) das formulações desenvolvidas.

INCI Name ¹	F1 (%)	F2 (%)
Disodium EDTA	0.2	0.2
Ammonium Acryloyldimethyl-taurate / VP Copolymer	0.5	0.5
Glycerin	6	6
Aqua	q.s.p. 100	q.s.p. 100
Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate	3	3
Caprylic/Capric Triglyceride	3	3
BHT	0.03	0.03
Propylene Glycol	1	1
Benzyl Alcohol (and) Xylitol (and) Caprylic Acid	1.5	1.5
Ascorbyl tetraisopalmitate	-	3
Panthenol	-	1

¹International Nomenclature Cosmetic Ingredients

conducted every seven days for 36 days. The formulations were stored in glass containers under controlled conditions of temperature (approximately 25 °C - room temperature, 37 °C, and 45 °C), humidity (70% RH), and light exposure using thermostated ovens (Eletrolab model 111FC) (20).

The stability tests of the formulations followed the protocols outlined in the Stability Guide for Cosmetic Products established by ANVISA (National Health Surveillance Agency) in Brazil (21).

Rheological behavior study

The rheological behavior of the formulations was analyzed using a DV-III cone and plate type digital rheometer (AMETEK Brookfield, Middleboro, MA, USA), with shear rate control. The rheological parameters assessed included rheological behavior and hysteresis area.

Physical stability was evaluated by subjecting the formulations to thermal stress at 37°C and 45°C while maintaining them at approximately room temperature ($\approx 25^\circ\text{C}$). Samples of 0.50 ± 0.01 g were collected over a period of 36 days (22,23).

The rotational speed was increased gradually from 0 to 250 rpm with 5-second intervals between each speed increment. This formed an ascending curve consisting of ten points that represent the relationship between 'Shear rate' and 'Shear stress'. Subsequently, a descending curve was generated by inversely decreasing the velocity (15).

realizadas a cada sete dias durante 36 dias. As formulações foram armazenadas em recipientes de vidro sob condições controladas de temperatura (aproximadamente 25 °C - temperatura ambiente - 37 °C e 45 °C), umidade (70% de UR), e exposição à luz utilizando estufas termostatizadas (Eletrolab modelo 111FC) (20).

Os testes de estabilidade das formulações seguiram os protocolos delineados no Guia de Estabilidade para Produtos Cosméticos estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no Brasil (21).

Estudo do comportamento reológico

O comportamento reológico das formulações foi analisado utilizando um reômetro digital DV-III do tipo cone e placa (AMETEK Brookfield, Middleboro, MA, , EUA), com controle de taxa de cisalhamento. Os parâmetros reológicos avaliados incluíram comportamento reológico e área de histerese.

A estabilidade física foi avaliada submetendo as formulações a estresse térmico a 37°C e 45°C, mantendo-as aproximadamente à temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$). Amostras de $0,50 \pm 0,01$ g foram coletadas ao longo de um período de 36 dias (22,23).

A velocidade de rotação foi aumentada gradualmente de 0 a 250 rpm com intervalos de 5 segundos entre cada incremento de velocidade. Isso formou uma curva ascendente consistindo de dez pontos que representam a relação entre 'Taxa de cisalhamento' e 'Tensão de cisalhamento'. Posteriormente, uma curva descendente foi gerada diminuindo inversamente a velocidade (15).

Prism 8.0.1 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA) was used to perform numerical integration of the obtained curves of the rheograms. The hysteresis area, which is indicative of the thixotropic phenomenon, was calculated by determining the area under the curve (22). All measurements were conducted in triplicate to ensure accuracy.

Texture and spreadability profile analysis

Texture and spreadability profile analysis were conducted using the TA.XT Plus[®] texturometer (Extralab Brasil; Jarinu, Brazil) and integrated with Exponent software. The method consists of the insertion of an analytical probe into the sample at a pre-determined speed and depth. The analyses were conducted 24 hours after formulation development, and all assessments were performed in quintuplicate.

The TTC Spreadability Ring (HDP/SR) probe was used to evaluate the spreadability of the formulations (15,24). The work of shear parameter was calculated as the area under the positive curve. The parameters used were a return distance of 25 mm, a return speed of 20 mm/sec, and a trigger force of 2 g (15,16).

Sensorial analysis

Sensory analysis was performed using a questionnaire that included statements related to spreadability, smoothness, moisturizing sensation, and stickiness (15,25). Fifty-two healthy participants were recruited following approval by the Ethics Committee for Research Involving Human Subjects at the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (CEP CAAE: 52158921.9.0000.5403). The study participants were untrained individuals between the ages of 18 and 29 with skin phototypes II to IV (26).

A 20 cm² circle was delineated on the anterior region of each participant's forearm for analysis. Within this area, a standardized amount of 2 mg/cm² was applied, resulting in 40 mg of formulation per region. The formulations, which were randomly selected, included the base vehicle (F1) and the vehicle added with the association of the active substances (F2).

The parameters analyzed after application were spreadability and smoothness. The parameters analyzed 10 minutes after application were stickiness and hydration. Participants were asked to evaluate each parameter by indicating whether they 'agree'

O software Prism 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) foi utilizado para realizar a integração numérica das curvas de reogramas obtidas. A área de histerese, que é indicativa do fenômeno tixotrópico, foi calculada determinando a área sob a curva (22). Todas as medições foram realizadas em triplicata para garantir precisão.

Análise do perfil de textura e espalhabilidade

A análise do perfil de textura e espalhabilidade foi conduzida utilizando o texturômetro TA.XT Plus[®] (Extralab Brasil; Jarinu, Brasil) e integrado com o software Exponent. O método consiste na inserção de uma sonda analítica na amostra a uma velocidade e profundidade pré-determinadas. As análises foram realizadas 24 horas após o desenvolvimento da formulação, e todas as avaliações foram realizadas em quintuplicata.

A sonda TTC Spreadability Ring (HDP/SR) foi utilizada para avaliar a espalhabilidade das formulações (15, 24). O parâmetro de trabalho de cisalhamento foi calculado como a área sob a curva positiva. Os parâmetros utilizados foram uma distância de retorno de 25 mm, uma velocidade de retorno de 20 mm/s e uma força de gatilho de 2 g (15,16).

Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada utilizando um questionário que incluía declarações relacionadas à espalhabilidade, suavidade, sensação de hidratação e pegajosidade (15,25). Foram recrutados 52 participantes saudáveis após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (CEP CAAE:52158921.9.0000.5403). Os participantes do estudo eram indivíduos não treinados com idades entre 18 e 29 anos e fototipos de pele II a IV (26).

Um círculo de 20 cm² foi delineado na região anterior do antebraço de cada participante para análise. Dentro dessa área, uma quantidade padronizada de 2 mg/cm² foi aplicada, resultando em 40 mg de formulação por região. As formulações, que foram selecionadas aleatoriamente, incluíam o veículo base (F1) e o veículo adicionado com a associação das substâncias ativas (F2).

Os parâmetros analisados após a aplicação foram espalhabilidade e suavidade. Os parâmetros analisados após 10 minutos da aplicação foram pegajosidade e hidratação. Os participantes foram solicitados a avaliar cada parâmetro indicando

'partially agree,' or 'disagree' with the following statements: 'The formulation has good spreadability,' 'The applied formulation has a soft touch,' 'The formulation is sticky,' and 'The formulation leaves the skin hydrated.'

Short-term clinical efficacy study

The clinical efficacy study was initiated following approval by the Ethics Committee for Research Involving Human Subjects at the Lusophone Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies (04/13), adhering to the principles of the Declaration of Helsinki. A total of eight participants, both men and women aged 25 to 35 years with skin phototypes II and III, were enrolled in the study.

Forearm measurements were taken at baseline (T0), after seven consecutive days of applying the formulations (T7), and after applying methyl nicotinate (MN) to three predetermined regions. Participants applied either the vehicle formulations (F1) or the formulations added with the vitamins (F2) to the first two regions. The third region served as a control, where no formulation was applied. The regions were randomly selected to ensure unbiased assessment.

The study used Laser Doppler technology (LDF, PeriFluxSystem 5000, Perimed AB, Järfälla, Sweden) to map the cutaneous microcirculation in each region. This non-invasive device scans a skin area with a laser, detects changes in light reflecting off moving blood, and generates a blood flow map in the skin, providing a detailed assessment of tissue perfusion. Perfusion values are expressed in arbitrary perfusion units (PU's). In this study, this technique proved to be an important method for characterizing and grading the micro-inflammatory response induced by MN.

Transepidermal water loss (TEWL) was measured using the Tewameter® TM 210 device (Courage & Khazaka; Cologne, Germany) coupled with specialized software. TEWL values were reported in $\text{g.m}^2.\text{h}^{-1}$ (27) and indicate the extent of skin barrier function damage, even when the skin appears intact. This equipment measures the amount of water that evaporates through the skin. It is an important parameter in assessing the integrity of the skin barrier (22). The Tewameter® probe indirectly measures the density gradient of water evaporation from the skin by the two pairs of sensors (temperature and relative humidity) inside the hollow cylinder.

se 'concordam,' 'concordam parcialmente' ou 'discordam' das seguintes declarações: 'A formulação tem boa espalhabilidade,' 'A formulação aplicada tem um toque suave,' 'A formulação é pegajosa' e 'A formulação deixa a pele hidratada'.

Estudo de eficácia clínica em curto prazo

O estudo de eficácia clínica foi iniciado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos no Research Center for Biosciences & Health Technologies da Universidade Lusófona (04/13), seguindo os princípios da Declaração de Helsinki. Um total de 8 participantes, homens e mulheres com idades entre 25 e 35 anos e fototipos de pele II e III, participaram do estudo.

Medições do antebraço foram realizadas no início (T0), após sete dias consecutivos de aplicação das formulações (T7) e após a aplicação de nicotinato de metila (MN) em três regiões predeterminadas. Os participantes aplicaram as formulações veiculares (F1) ou as formulações adicionadas das vitaminas (F2) nas duas primeiras regiões. A terceira região serviu como controle, onde nenhuma formulação foi aplicada. As regiões foram selecionadas aleatoriamente para garantir uma avaliação imparcial.

O estudo utilizou a tecnologia de Laser Doppler (LDF, PeriFluxSystem 5000, Perimed AB, Järfälla, Suécia) para mapear a microcirculação cutânea em cada região. Este dispositivo não invasivo escaneia uma área da pele com um laser, detecta mudanças na luz refletida pelo movimento do sangue e gera um mapa de fluxo sanguíneo na pele, fornecendo uma avaliação detalhada da perfusão tecidual. Os valores de perfusão são expressos em unidades de perfusão arbitrárias (PU's). Neste estudo, esta técnica mostrou ser um método importante para caracterizar e classificar a resposta micro-inflamatória induzida por MN.

A perda transepidermica de água (TEWL) foi medida usando o dispositivo Tewameter® TM 210 (Courage & Khazaka; Colônia, Alemanha) acoplado a software especializado. Os valores de TEWL foram relatados em $\text{g.m}^2.\text{h}^{-1}$ (27) e indicam a extensão do dano à função de barreira da pele, mesmo quando a pele parece intacta. Este equipamento mede a quantidade de água que evapora através da pele. É um parâmetro importante na avaliação da integridade da barreira cutânea (22). A sonda Tewameter® mede indiretamente o gradiente de densidade da evaporação da água da pele pelos dois pares de sensores (temperatura e umidade relativa) dentro do cilindro oco.

Statistical analysis and presentation of results

The experimental data was analyzed using Prism 8 software. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. For normally distributed data, one-way ANOVA with Tukey's post-test was employed. For non-normal cases, the Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's post-test.

Results

Stability of formulations and visual evaluation study

The formulations, with or without active substances, passed the centrifugation test, showing no phase separation 24 hours after preparation. All formulations had a pH range of 4.5 to 5.5 (28). Moreover, there was no significant ($p > 0.05$) change in pH during the study period.

Additionally, no changes in color, odor, homogeneity, or phase separation were observed during the study period when kept at room temperature or subjected to thermal stress.

Rheological behavior study

The formulations under study showed a non-Newtonian rheological behavior with thixotropic pseudoplastic characteristics (Figure 1), with a flow index lower than 1 and viscosity recovery after shear reduction (15).

Análise estatística e apresentação dos resultados

Os dados experimentais foram analisados utilizando o software Prism 8. A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para dados normalmente distribuídos, foi empregada a análise de variância (ANOVA) de um fator com o teste de Tukey como pós-teste. Para casos não normais, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn.

Resultados

Estudo de estabilidade das formulações e avaliação visual

As formulações, com ou sem substâncias ativas, passaram no teste de centrifugação, não apresentando separação de fases após 24 horas de preparação. Todas as formulações apresentaram um intervalo de pH de 4,5 a 5,5 (28).

Além disso, não houve alteração significativa ($p > 0,05$) no pH durante o período do estudo. Além disso, não foram observadas alterações na cor, odor, homogeneidade ou separação de fases durante o período do estudo quando mantidas à temperatura ambiente ou submetidas a estresse térmico.

Estudo do comportamento reológico

As formulações em estudo apresentaram comportamento reológico não newtoniano do tipo pseudoplástico tixotrópico (Figura 1), com índice de fluxo menor que 1 e recuperação da viscosidade após redução do cisalhamento (15).

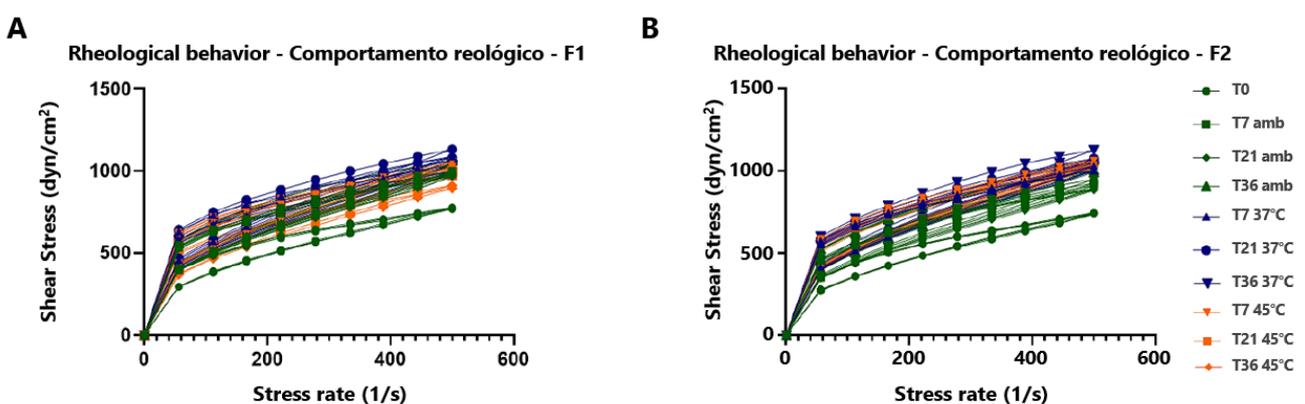


Figure 1 - Rheological behavior of formulations F1 (A) and F2 (B).

Figura 1 - Comportamento reológico das formulações F1 (A) e F2 (B).

Regarding the hysteresis area, F2 presented significantly ($p < 0.05$) lower values compared to F1 (Figure 2).

Em relação à área de histerese, F2 apresentou valores significativamente inferiores comparado a F1 (Figura 2).

Texture and spreadability profile analysis

Análise do perfil de textura e espalhabilidade

Regarding the texture and spreadability profile, the formulation added with the active substances showed significantly lower values ($p < 0.05$) in relation to the vehicle formulation in terms of firmness and work of shear (Figure 3).

Em relação ao perfil de textura e espalhabilidade, a formulação acrescida com as substâncias ativas apresentou valores significativamente inferiores em relação a formulação veículo nos parâmetros de firmeza e trabalho de cisalhamento (Figura 3).

Sensorial Analysis

Análise Sensorial

An untrained panel was used for the sensory analysis, and both formulations presented a similar profile regarding the parameters of spreadability, smoothness, hydration sensation, and stickiness (Figures 4 and 5).

Para a análise sensorial foi utilizado um painel não treinado e ambas as formulações apresentaram um perfil semelhante quanto aos parâmetros de espalhabilidade, sensação ao toque, hidratação e pegajosidade (Figuras 4 e 5).

Hysteresis area – Área de histerese

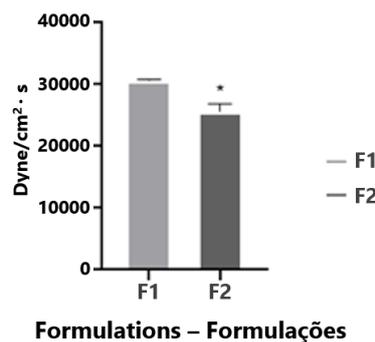
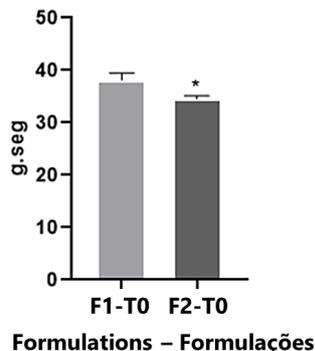


Figure 2 - Hysteresis area of formulations F1 and F2. (*) Represents the significant difference between the two formulations ($p < 0.05$).

Figura 2 - Área de histerese das formulações F1 e F2. (*) Representa a diferença significativa em relação às duas formulações ($p < 0,05$).

A

Work of shear – Trabalho de Cisalhamento



B

Firmness – Firmeza

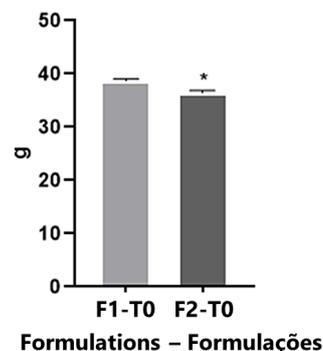


Figure 3 - Texture profile and spreadability of formulations F1 and F2: (A) Work of shear; (B) Firmness. (*) Represents the significant difference between the two formulations ($p < 0.05$).

Figura 3 - Perfil de textura e espalhabilidade das formulações F1 e F2, sendo: (A) Trabalho de cisalhamento; (B) Firmeza. (*) Representa a diferença significativa em relação às duas formulações ($p < 0,05$).

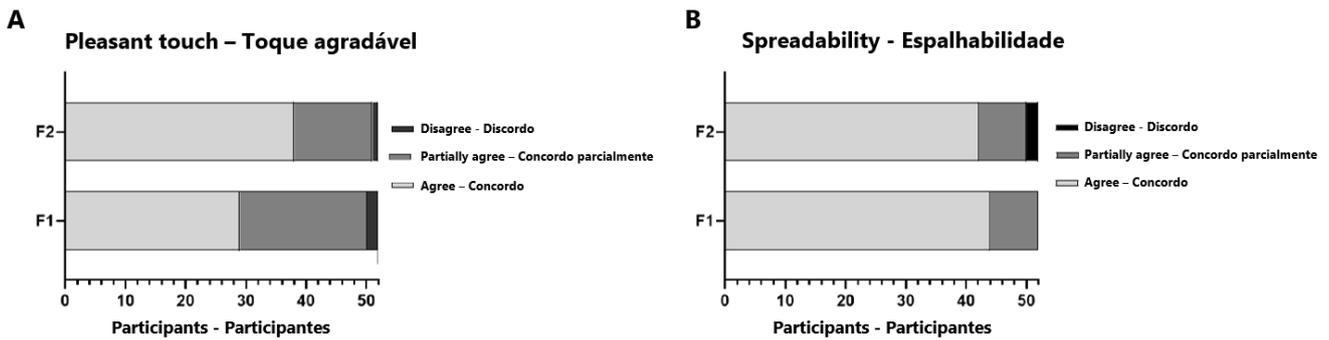


Figure 4 - Result of sensory analysis after applying formulations F1 and F2.
Figura 4 - Resultado da análise sensorial após a aplicação das formulações F1 e F2.

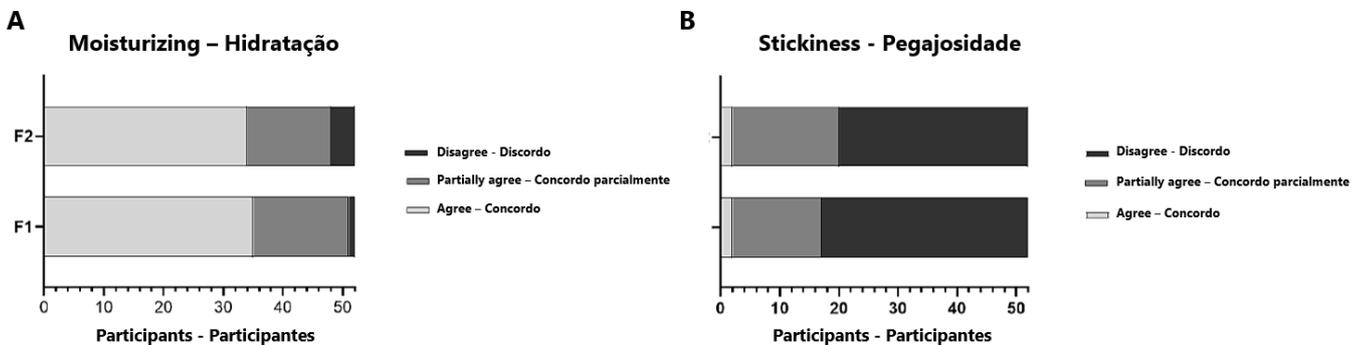


Figure 5 - Result of sensory analysis after 10 minutes of application of formulations F1 and F2.
Figura 5 - Resultado da análise sensorial após 10 minutos de aplicação das formulações F1 e F2.

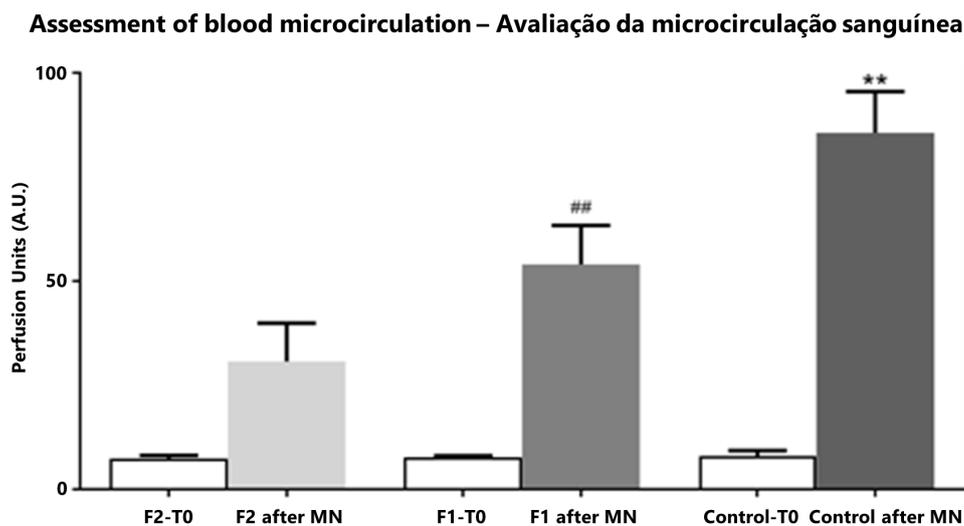


Figure 6 - Evaluation of skin blood microcirculation after 7 days of use of formulations F1 and F2 (t0) and after methylnicotinate (MN) application. ## Significant ($p \leq 0.05$) when compared to F2 after MN application. ** Significant ($p \leq 0.001$) when compared to F2 after MN application.
Figura 6 - Avaliação da microcirculação sanguínea da pele após 7 dias de uso das formulações F1 e F2 (t0) e após a aplicação do metilnicotinato (MN). ## Significante ($p \leq 0.05$) quando comparado com F2 após a aplicação do MN. ** Significante ($p \leq 0.001$) quando comparado com F2 após a aplicação do MN.

Short-term clinical efficacy study

Blood microcirculation before MN application (t0) has not shown statistical significance. After applying methyl nicotinate, it is possible to observe that the application of the F2 formulation significantly ($p < 0.05$) reduced the microcirculation when compared to the vehicle formulation (F1) and the control region (Figure 6). In addition, this reduction in inflammation can be observed through the coloration of the erythema (Figure 7) since the erythema is less intense in the area where the F2 formulation was applied.

Estudo de eficácia clínica em curto prazo

A microcirculação sanguínea antes da aplicação do MN (t0) não mostrou diferença estatística. Após a aplicação do metilnicotinato é possível observar que a aplicação da formulação F2 diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a microcirculação em relação a formulação veículo (F1) e a região controle (Figura 6). Além disso, essa redução da inflamação pode ser observada por meio da coloração do eritema (Figura 7), uma vez que o eritema é menos intenso na área em que foi aplicada a formulação F2.



Figure 7 - Representative images of the erythema formed after application of 1% Methyl Nicotinate. A- region of application of the F2 formulation. B- the region of application of the F1 formulation. C- control region without cosmetic intervention.

Figura 7 - Imagens representativas do eritema formado após a aplicação do Metilnicotinato 1%. A- região de aplicação da formulação F2. B- região de aplicação da formulação F1. C- região controle sem intervenção cosmética.

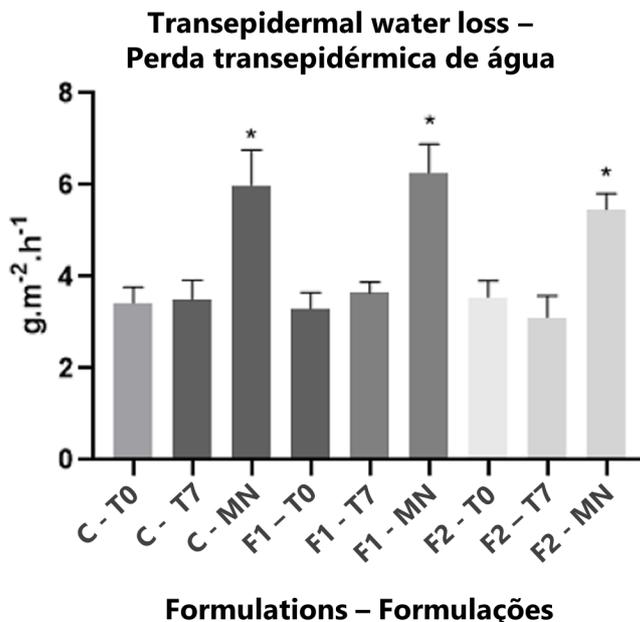


Figure 8 - Evaluation of transepidermal water loss at the initial time (T0), after 7 days of use of formulations F1 and F2, and after application of methyl nicotinate (MN). C – control * significant increase ($p > 0.05$) in relation to time 7 days.

Figura 8 - Avaliação da perda transepidérmica de água no tempo inicial (T0), após 7 dias de uso das formulações F1 e F2 e após a aplicação do metilnicotinato (MN). C - controle * - aumento significativo ($p > 0,05$) em relação ao tempo 7 dia.

The use of F1 for seven days did not reduce the action of MN on the skin since the transepidermal water loss increased in the same proportion as the control (approximately 68%) (Figure 8). However, the continuous use of F2 showed a smaller increase in TEWL after the application of the irritating agent (MN) when compared to the control and F1.

Discussion

The formulations with or without the active substances were stable in the stability tests, where the pH of the formulations remained in the skin compatibility range (7,29). Regarding the centrifugation test, all formulations were homogeneous and considered stable in this test. In addition, no change in color or odor or phase separation was observed during the study period.

From the rheograms, it was possible to analyze the rheological behavior of the formulations. The formulation were stable during the 36 days at the three studied temperature conditions, as there were no peaks or changes in the rheograms during the analysis period. Furthermore, the addition of active substances did not alter the rheological profile of the formulations.

In addition, the hysteresis area, resulting from the thixotropy phenomenon, is the area calculated between the ascending and descending curves. Thixotropy indicates the time the material takes to reorganize and return to the initial structure after the shear is removed (22, 30). Thus, the hysteresis area is directly proportional to thixotropy; that is, the smaller the hysteresis area, the lower the thixotropy (31). Therefore, F1 presented a higher value of hysteresis area when compared to F2, showing that the addition of active substances generates a decrease in the time that the structure of the formulation takes to reorganize itself (22).

By comparing different formulations, it is possible to correlate instrumental texture measurements with the assessment of sensory properties. The work of shear is inversely proportional to the spreadability of the formulation on the skin (15,23,32), and the F2 formulation presented a work of shear value significantly lower than F1. Still, this difference was not noticed by the participants in the spreadability parameter of the sensory properties analysis.

O uso de F1 por sete dias não reduziu a ação do MN na pele, pois a perda transepidérmica de água aumentou na mesma proporção que o controle (aproximadamente 68%) (Figura 8). No entanto, o uso contínuo de F2 mostrou um aumento menor na TEWL após a aplicação do agente irritante (MN), quando comparado ao controle e F1.

Discussão

As formulações acrescidas ou não das substâncias ativas apresentaram estáveis frente aos testes de estabilidade, onde o pH das formulações permaneceram na faixa de compatibilidade cutânea (7,29). Em relação ao teste de centrifugação, todas as formulações apresentaram-se homogêneas e consideradas estáveis frente a este teste. Além disso, não foi observado alteração de cor, odor e separação de fases durante o período de estudo.

A partir dos reogramas foi possível analisar o comportamento reológico das formulações, onde elas se apresentaram estáveis durante os 36 dias nas três condições de temperatura, uma vez que não houve picos ou alterações nos reogramas durante o período de análise. Ademais, é possível afirmar que a adição das substâncias ativas não alterou o perfil reológicos das formulações.

Além disso, a área de histerese, resultante do fenômeno de tixotropia, é a área calculada entre as curvas ascendente e a descendente. A tixotropia indica o tempo que o material leva para se reorganizar e retornar à estrutura inicial depois que o cisalhamento é removido (22,30). Assim, a área de histerese é diretamente proporcional à tixotropia, ou seja, quanto menor a área de histerese, menor a tixotropia (31). Dessa forma, a F1 apresentou maior valor de área de histerese quando comparada com a F2, mostrando que a adição das substâncias ativas gera uma diminuição do tempo que a estrutura da formulação leva para se reorganizar (22).

Ao comparar diferentes formulações é possível correlacionar as medidas instrumentais de textura com a avaliação das propriedades sensoriais. O trabalho de cisalhamento (work of shear) é inversamente proporcional à espalhabilidade da formulação sobre a pele (15,23,32), sendo que a formulação F2 apresentou um valor de work of shear significativamente inferior à F1, porém tal diferença não foi notada pelos participantes na análise sensorial no parâmetro de espalhabilidade. Além disso, a firmeza altera a microestrutura da emulsão, como foi observado na redução desse parâmetro para

Furthermore, firmness alters the microstructure of the emulsion, as observed in the reduction of this parameter for the F2 formulation. This may be related to the large structure of ascorbyl tetraisoalmitate, since it has four isoalmitate chains around vitamin C (6), making the microstructure of the emulsion less cohesive. However, no difference was noticed in sensory perception since an untrained panel was used (33). Thus, the choice of this panel is related to the objective of the study, which is to mimic the final consumer, considering not only the physical characteristics of the formulation but also the cognitive process, such as emotions and personal preferences (34). Furthermore, both formulations were not considered sticky, indicating that the addition of active substances did not alter the participants' sensory perception in relation to this parameter.

In this way, the participants characterized the F2 formulation with a more pleasant touch than the F1, and the addition of the active substances did not influence the spreadability. Furthermore, 96.15% of the participants considered both formulations as non-sticky, indicating that D-panthenol and ascorbyl tetraisoalmitate did not change the cohesiveness of the formulation (15).

Nicotinates, such as methyl nicotinate, rapidly penetrate the stratum corneum via the intercellular route and, when they reach the dermis, lead to the production of inflammatory mediators, such as prostaglandins, which momentarily promote erythema and vasodilation (35). Thus, MN damages the skin barrier, promoting a hydrolipidic imbalance and disarray in the structure of lipids in the stratum corneum (36). This imbalance is one of the mechanisms responsible for increased skin permeability, which can be assessed through transepidermal water loss (36).

The TEWL values provide valuable information about the ability of the skin to retain moisture and protect against external factors such as allergens, irritants, and pathogens. Higher TEWL values indicate a compromised skin barrier, which can lead to dryness, sensitivity, and increased susceptibility to skin conditions. Monitoring TEWL values is particularly important in dermatology and cosmetic research, as it helps evaluate the efficacy of skincare products, treatments, and interventions aimed at improving skin barrier function (22).

a formulação F2. Isso pode estar relacionado com grande estrutura do tetraisoalmitato de ascorbila, uma vez que apresenta quatro cadeias de isoalmitato ao redor da vitamina C (6), tornando a microestrutura da emulsão menos coesa. Todavia, novamente tal diferença não foi notada na percepção sensorial, uma vez que foi utilizado um painel não treinado (33). Dessa forma, a escolha deste painel, relaciona-se com o objetivo do estudo, pois visa mimetizar o consumidor final, levando em consideração não apenas as características físicas da formulação, mas também o processo cognitivo, como as emoções e preferências pessoais (34). Além disso, ambas as formulações não foram consideradas pegajosas, indicando que a adição das substâncias ativas não alteraram a percepção sensorial dos participantes em relação a esse parâmetro.

Dessa forma, os participantes caracterizaram a formulação F2 com um toque mais agradável do que a F1 e a adição das substâncias ativas não influenciou a espalhabilidade. Além disso, 96,15% dos participantes consideraram as duas formulações como não pegajosas, indicando que o D-panthenol e o tetraisoalmitato de ascorbila não alteraram a coesividade da formulação (15).

Nicotinatos, como o metilnicotinato, penetram rapidamente pelo estrato córneo pela rota intercelular e, quando atingem a derme, levam a produção de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas, que promovem o eritema e a vasodilatação momentaneamente (35). Dessa forma, o MN danifica a barreira cutânea, promovendo um desbalanço hidrolipídico e desarranjo na estrutura dos lipídios no estrato córneo (36). Esse desbalanço é um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da permeabilidade na pele, o qual é possível avaliar por meio da perda transepidermica de água (36).

Os valores de TEWL fornecem informações valiosas sobre a capacidade da pele de reter umidade e proteger contra fatores externos como alérgenos, irritantes e patógenos. Valores mais altos de TEWL indicam uma barreira cutânea comprometida, o que pode levar a ressecamento, sensibilidade e aumento da suscetibilidade a condições da pele. Monitorar os valores de TEWL é particularmente importante na dermatologia e na pesquisa cosmética, pois ajuda a avaliar a eficácia de produtos para cuidados com a pele, tratamentos e intervenções destinadas a melhorar a função da barreira cutânea (22).

Thus, the continuous use of the formulations for seven days did not change the TEWL. However, using F1 did not protect the skin barrier since there was an increase in TEWL at T7 after NM application. In the region where F2 was applied, the increase in TEWL was smaller, indicating that the formulation with the addition of active substances has the potential to protect skin barrier function.

In addition, the increase in TEWL after the application of MN indicates that the skin barrier has been damaged, and, with this, there is an induction of erythema and microinflammation. The F2 formulation reduced the damage caused by MN, by reducing microcirculation in the area where the MN was applied, which can be associated with an anti-inflammatory effect.

The observed results may be related to the effects of the vitamin, as D-panthenol is known for its emollient, repairing, moisturizing, and anti-inflammatory properties. It can accelerate cell regeneration, helping to heal superficial injuries such as burns, fissures, plastic surgery, and ulcerative and allergic dermatoses (12, 13). Furthermore, vitamin C functions as an antioxidant and can protect the skin from free radicals (6), since MN, derived from nicotinic acid, can induce the release of endoperoxidase and free radicals in the skin (19).

Conclusion

The developed formulations were stable during the period of study. Regarding sensory properties, the F2 formulation was evaluated as smoother than the F1, and the addition of active substances did not interfere with the participant's perception since both presented a similar profile in terms of moisturizing, stickiness, and spreadability. After the induction of vasodilation with methyl nicotinate, the application of F2 limited skin micro-inflammation and reduced damage to the skin barrier compared to the vehicle and control regions. Finally, the cosmetic formulation developed with the association of vitamins was able to attenuate the effects of methyl nicotinate due to an anti-inflammatory action.

Assim, o uso contínuo das formulações por sete dias não alterou a TEWL. No entanto, o uso de F1 não protegeu a barreira da pele, pois houve um aumento na TEWL em T7 após a aplicação de NM. Na região onde F2 foi aplicado, o aumento na TEWL foi menor, indicando que a formulação com a adição de substâncias ativas têm o potencial de proteger a função da barreira cutânea.

Além disso, após a aplicação do MN, o aumento da TEWL indica que a barreira cutânea foi danificada e, com isso, há indução do eritema e da microinflamação. A formulação F2 diminuiu o dano causado pelo MN, por reduzir significativamente a microcirculação na área onde foi aplicado o MN, o que pode ser associado a um efeito anti-inflamatório.

Os resultados observados podem estar relacionados aos efeitos da vitamina, uma vez que o D-pantenol é conhecido por suas propriedades emolientes, reparadoras, hidratantes e anti-inflamatórias. Ele pode acelerar a regeneração celular, ajudando a curar lesões superficiais como queimaduras, fissuras, cirurgias plásticas e dermatoses ulcerativas e alérgicas (12,13). Além disso, a vitamina C atua como antioxidante e pode proteger a pele dos radicais livres (6), uma vez que o MN, derivado do ácido nicotínico, pode induzir a liberação de endoperoxidase e radicais livres na pele (19).

Conclusão

As formulações desenvolvidas foram estáveis durante o período de estudo. Em relação às propriedades sensoriais, a formulação F2 foi avaliada como mais suave do que a F1 e a adição das substâncias ativas não interferiram na percepção sensorial dos participantes, uma vez que, ambas apresentaram um perfil semelhante quanto a hidratação, pegajosidade e espalhabilidade. Após a indução da vasodilatação com metilnicotinato, a aplicação da F2 limitou a microinflamação na pele e reduziu os danos na barreira cutânea em relação ao veículo e região controle. Por fim, a formulação cosmética desenvolvida acrescida da associação das vitaminas foi eficaz na atenuação dos efeitos do metilnicotinato, devido a ação anti-inflamatória.

Authors Contribution Statement

LF was responsible for the experimental, data collection, and analysis, in addition to writing the article; LK was responsible for the collection and evaluation of the results, in addition to writing revision; SF was responsible for evaluating the results and writing revision; LMR e PMC co-coordinated the study, including supervising the conceptual design; PMC supervised the study and was responsible for the final review of the article.

Funding

The authors would like to thank FAPESP - São Paulo Research Foundation (grant number: 2022/05122-6 and 2021/10186-0) for financial support.

Conflicts of interest

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

Declaração de contribuição dos autores

LF foi responsável pela experimental, coleta e análise dos dados, além da redação do artigo; LK foi responsável pela coleta e avaliação dos resultados, além da revisão da redação; SF foi responsável pela avaliação dos resultados e revisão da redação; LMR e PMC co-coordenaram o estudo, incluindo a supervisão do desenho conceitual; PMC coordenou o estudo, inclusive o desenho conceitual, supervisionou e foi responsável pela revisão final do artigo.

Financiamento

Os autores gostariam de agradecer à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos: 2022/05122-6 e 2021/10186-0) pelo apoio financeiro.

Conflito de interesses

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

References / Referências

1. Krutmann, J., Bouloc, A., Sore, G., Bernard, B. A., & Passeron, T. (2017). The skin aging exposome. *Journal of dermatological science*, 85(3), 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.09.015>
2. Passeron, T., Krutmann, J., Andersen, M. L., Katta, R., & Zouboulis, C. C. (2020). Clinical and biological impact of the exposome on the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34, 4-25. <https://doi.org/10.1111/jdv.16614>
3. Vineis, P., Robinson, O., Chadeau-Hyam, M., Dehghan, A., Mudway, I., & Dagnino, S. (2020). What is new in the exposome?. *Environment international*, 143, 105887. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105887>
4. Manela-Azulay, M., Mandarin-De-Lacerda, C. A., Perez, M. D. A., Filgueira, A. L., & Cuzzi, T. (2003). Vitamina C. *Anais brasileiros de dermatologia*, 78, 265-272. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000300002>
5. Fries, A. T., & Frasson, A. P. Z. (2010). Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. *Revista Contexto & Saúde*, 10(19), 17-23. <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2010.19.17-23>
6. Bonilha, G. C., Costa, G. M. D. & Campos, P. M. B. G. M. (2020). Rheological, texture, and sensory analyses and in vivo clinical efficacy of cosmetic formulations containing ascorbyl tetraisopalmitate. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(1), 90-101. <https://doi.org/10.19277/bbr.17.1.228>
7. Campos, P. M. B. G. M., Gianeti, M. D., Camargo JR, F. B., & Gaspar, L. R. (2012). Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: Stability studies and in vivo efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(3), 580-586. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.08.009>
8. Jeon, J. S., Kim, H. T., Kim, M. G., Oh, M. S., Hong, S. R., Yoon, M. H., ... & Abd el-Aty, A. M. (2016). Simultaneous Detection of Glabridin, (-)- α -Bisabolol, and Ascorbyl Tetraisopalmitate in Whitening Cosmetic Creams Using HPLC-PAD. *Chromatographia*, 79, 851-860. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3104-2> <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3104-2>
9. Goldberg, D. J., Mraz-Robinson, D., & Granger, C. (2020). Efficacy and safety of a 3-in-1 antiaging night facial serum containing melatonin, bakuchiol, and ascorbyl tetraisopalmitate through clinical and histological analysis. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(4), 884-890. <https://doi.org/10.1111/jocd.13329>
10. Narda, M., Brown, A., Muscatelli-Groux, B., Grimaud, J. A. & Granger, C. (2020). 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. *Dermatology and Therapy*, 10(1), 191-202. <https://doi.org/10.1007/s13555-019-00349-8>
11. Santos, A. C. D. D., Araújo, A. M., Rocha, B. D. O., Rocha, B. D. O., Chaves, M. F. S., & Coelho, A. G. (2019). Estudo da estabilidade de formulações de uso tópico contendo vitamina C manipulada em farmácias da cidade de Teresina-Pi/Study of the stability of topical use formulations containing vitamin C manipulated in pharmacies of the city of Teresina-Pi. *Brazilian Journal of Health Review*, Curitiba, 2(2), 756-767.
12. Aresenie, L.V., Lacatusu, I., Oprea, O., Bordei, N., Bacalum, M. & Badea, N. (2020). Azelaic acid-willow bark extract-panthenol-Loaded lipid nanocarriers improve the hydration effect and antioxidant action of cosmetic formulations. *Industrial Crops and Products*, 154, 112658. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112658>
13. Hroboňová, L. & Lomenova, A. (2020). Determination of panthenol enantiomers in cosmetic preparations using an achiral-chiral-coupled column HPLC system. *Chirality*, 32(2), 191-199. <https://doi.org/10.1002/chir.23152>
14. Shirata, M. M. F. & Campos, P. M. B. G. M. (2016). Importance of texture and sensorial profile in cosmetic formulations development. *Surgical e Cosmetic Dermatology*, 8(3), 223-230. <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201683861>
15. Calixto, L. S. & Campos, P. M. B. G. M. (2017). Physical Mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and sensorial properties. *International Journal of Cosmetic Science*. 39(5), 527-534. <https://doi.org/10.1111/ics.12406>
16. Tai, A., Bianchini, R. & Jachowicz, J. (2014) Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 36(4), 291-304. <https://doi.org/10.1111/ics.12125>
17. Melo, M. O. & Campos, P. M. B. G. M. (2018). Characterization of oily mature skin by biophysical and skin imaging techniques. *Skin Research and Technology*, 24(3) 386-395. <https://doi.org/10.1111/srt.12441>
18. Jumbelic, L. C., Liebel, F.T. & Southall, M. D. (2006). Establishing a minimal erythema concentration of methyl nicotinate for optimum evaluation of anti-inflammatories. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19(3), 147-152. <https://doi.org/10.1159/000092595>
19. Ratz-Lyko, A., Arct, J. & Pytkowska, K. (2016). Moisturizing and antiinflammatory properties of cosmetic formulations containing Centella asiatica extract. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(1), 27-33. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.180247>
20. Felippim, E. C., Marcato, P. D. & Campos, P. M. B. G. M. (2020). Development of Photoprotective Formulations Containing Nanostructured Lipid Carriers: Sun Protection Factor, Physical-Mechanical and Sensorial Properties. *AAPS PharmSciTech*, 21(8), 311.. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01858-y>
21. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. (2004). Volume 1.
22. Kakuda, L., Campos, P. M. B. G. M., Zanin, R. B., & Favaro, L. N. (2023). Development of multifunctional sunscreens: Evaluation of physico-mechanical and film-forming properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 635, 122705. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122705>
23. Calixto, L. S.; Infante, V. H. P.; Campos, P. M. B. G. M. (2018) Design and Characterization of Topical Formulations: Correlations Between Instrumental and Sensorial Measurements. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1512-1519. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0960-024>
24. Behera, B., Singh V. K., Kulanthaivel, S., Bhattacharya, M. K, Paramanik, K & Banerjee I. (2015). Physical and mechanical properties of sunflower oil and synthetic polymers based bigels for the delivery of nitroimidazole antibiotic—a therapeutic approach for controlled drug delivery. *European Polymer Journal*, 64, 253-264. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.018>
25. Marcon, A. F. V., Wagemaker, T. A., & Campos, P. M. B. G. M. (2014) Rheology, clinical efficacy and sensorial of a silicone-based formulation containing pearl extract. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 11(2), 247-255. <https://doi.org/10.19277/bbr.11.2.96>
26. Pathak, M.A. & Fitzpatrick, T.B. (1993). Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis and skin cancer with sun-protective agents. In Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. McGraw-Hill, New York, 1689-1717.
27. Melo, M.O. & Campos, P.M.B.G.M. (2019). Application of biophysical and skin imaging techniques to evaluate the film-forming effect of cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 41(6), 579-584. <https://doi.org/10.1111/ics.12577>

28. Infante, V. H. P., Leite, M. G. A. & Campos, P.M.B.G.M. (2023). Film-Forming Properties of Topical Formulations for Skin and Hair: In Vivo and In Vitro Studies Using Biophysical and Imaging Techniques. *AAPS PharmSciTech*, 24, 29-38. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02472-w>
29. Andrade, J. P., Wagemaker, T. A. L., Mercurio, D. G., & Campos, P. M. B. G.M. (2018). Benefits of a dermocosmetic formulation with vitamins B3 and a B6 derivative combined with zinc-PCA for mild inflammatory acne and acne-prone skin. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(2), 214-223. <https://doi.org/10.19277/bbr.15.2.188>
30. Lee, C. H., Moturi, V., e Lee, Y. (2009) Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release*, 136(2), 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.02.013>
31. Chorilli, M., Campos, G. R., & Bolfarini, P. M. (2009). Desenvolvimento e estudo da estabilidade físico-química de emulsões múltiplas A/O/AEO/A/O acrescidas de filtros químicos e manteiga de karité. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(6), 936-40.
32. Terescenco, D., Picard, C., Clemenceau, F., Grisel, M., & Savary, G.(2018). Influence of the emollient structure on the properties of cosmetic emulsion containing lamellar liquid crystals. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 536, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.08.017>
33. Richard, C., Tillé-Salmon, B., & Mofid, Y. (2016). Contribution to interplay between a delamination test and a sensory analysis of mid-range lipsticks. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(1), 100-108. <https://doi.org/10.1111/ics.12242>
34. Pensé-Lhéritier, A. M. (2015). Recent developments in the sensorial assessment of cosmetic products: A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(5), 465-473. <https://doi.org/10.1111/ics.12223>
35. Remane, Y., & C. S. Leopold. (2006). Time of erythema onset after application of methyl nicotinate ointments as response parameter: influence of penetration kinetics and enhancing agents. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19(6), 303-310. <https://doi.org/10.1159/000095250>
36. Mohammed, D., Hirata, K., Hadgraft, J., & Lane, M. E. (2014). Influence of skin penetration enhancers on skin barrier function and skin protease activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51, 118-122. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.09.009>