


## Exploiting the Potential of *Ankistrodesmus braunii* Polysaccharides: *In Vitro* Antioxidant Activity and *In Vivo* Cutaneous Biocompatibility

### Explorando o Potencial dos Polissacarídeos de *Ankistrodesmus braunii*: Atividade Antioxidante *In Vitro* e Biocompatibilidade Cutânea *In Vivo*


Ana Lucía Morocho-Jácome <sup>1</sup> , João Carlos Monteiro de Carvalho <sup>2</sup> , Danilo Martini Rosolia <sup>1</sup> , Maria Valéria Robles Velasco <sup>1</sup> , Laerty Garcia de Sousa Cabral <sup>3</sup> , Patrícia Rijo <sup>4</sup> , Catarina Rosado <sup>4</sup> , André Rolim Baby <sup>1</sup>  

**Keywords:** Skin biocompatibility, *in vitro* antioxidant activity, gel, corneometer, tewameter

**Palavras-chave:** Biocompatibilidade cutânea, atividade antioxidante *in vitro*, gel, corneômetro, tewameter

#### To Cite:

Ana Lucía Morocho-Jácome et. al (2025) Exploiting the Potential of *Ankistrodesmus braunii* Polysaccharides: *In Vitro* Antioxidant Activity and *In Vivo* Cutaneous Biocompatibility. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 22(1), 1-13.

 <https://doi.org/10.19277/bbr.22.1.348>

1 - Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil

2 - Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil

3 - Department of Experimental Pathophysiology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo 1912-1925, Brazil

4 - CBIOS, Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, 1749-024 Lisbon, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:  
andrerb@usp.br

Received / Recebido: 22/12/2024  
Accepted / Aceite: 27/02/2025

#### Abstract

Current demands for sustainable cosmetic sources containing naturally derived compounds have led to extensive research for promising microalgae strains for large-scale cultivation. Given the enormous variety of microalgae strains, as well as their diverse cosmetic potential, here, we cultivated *Ankistrodesmus braunii* in tubular photobioreactors to extract polysaccharides (PSs) aiming their incorporation into a dermocosmetic prototype gel. *In vitro* antioxidant activity was determined by the DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay, and *in vivo* experiments were performed on participants, measuring skin superficial (SK) hydration and transepidermal water loss (TEWL) to determine cutaneous biocompatibility, i.e., the PS safety. *A. braunii* aqueous PS had superior performance through the DPPH• test, thus, it was incorporated in a gel sample, and its safety profile was established by the cutaneous biocompatibility assay. The biocompatibility of the samples was confirmed by the SK hydration and TEWL results, which were not affected after the application of the gels. Our results suggested not only the biocompatibility of the microalgae PS dermocosmetic, but also the *in vitro* antioxidant potential, confirming the viability of this material as a new ingredient in cosmetic formulations.

#### Resumo

As demandas atuais por fontes cosméticas sustentáveis contendo compostos de origem natural conduziram à pesquisa extensa de cepas promissoras de microalgas para cultivo em larga escala. Dada a enorme variedade de cepas de microalgas, bem como seu potencial cosmético diverso, neste estudo, foi cultivado *Ankistrodesmus braunii* em fotobiorreatores tubulares para extrair polissacarídeos (PSs), visando incorporação em um protótipo de gel dermocosmético. A atividade antioxidante *in vitro* foi determinada pelo ensaio DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), e os experimentos *in vivo* foram realizados com participantes, medindo-se a hidratação superficial da pele (SK) e a perda de água transepidérmica (TEWL) para avaliar a biocompatibilidade cutânea, ou seja, a segurança dos PSs. Os PSs de *A. braunii* apresentaram desempenho superior no teste DPPH•, assim, foram incorporados a um protótipo de gel, cujo perfil de segurança foi estabelecido por meio do ensaio de biocompatibilidade cutânea. A biocompatibilidade das amostras foi confirmada pelos resultados de SK e TEWL, que não foram afetados após a aplicação dos géis. Os resultados sugeriram não apenas a biocompatibilidade dos PSs no dermocosmético, mas, também, o potencial antioxidante *in vitro*, confirmando a viabilidade deste material como um novo ingrediente em formulações cosméticas.

## Introduction

Consumers increasingly demand highly effective cosmetic products. Aging-related skin concerns further necessitate the regular use of dermocosmetics tailored to specific skin needs. Moreover, recent advancements in cosmetic science have highlighted the importance of incorporating novel, sustainable ingredients derived from natural sources. Our research group has identified several such compounds from natural origins with potential applications in dermocosmetic formulations (1–3). The diversity of microalgae offers opportunities to obtain several kinds of compounds with high potential for application in dermocosmetics. For instance, pigments were well-described due to their antioxidant potential (4–6). Furthermore, lipophilic and hydrophilic compounds with high value-added, such as structural polysaccharides (PS) extracted from microalgae biomass and extracellular polymeric substances, have revealed practical applications due to the rheological properties, as well as to many biological activities, for instance, protecting cells from oxidative damage (7–9).

A few species from the *Ankistrodesmus* genus (Chlorophyceae) were successfully cultivated for biodiesel production due to the lipid content (10–12). However, it should be noted that some nutrient and environmental conditions, such as pH, CO<sub>2</sub> level, temperature, and light intensity, are the main factors behind changes in biomass composition during photosynthesis. For instance, carbohydrates and lipids are the central competing pathways for the biosynthesis of storage products in microalgae species. Thus, carbohydrates are an important raw material in fermentative biofuel production (13). Additionally, phototrophic, mixotrophic, and heterotrophic were tested as mode cultivations and monoculture or mix-culture of *Ankistrodesmus* sp. with *Chlorella* sp. (10). Moreover, the presence of extracellular polymeric substances from *Ankistrodesmus falcatus* var. *acicularis* (9).

*A. braunii* has been successfully cultivated in tubular photobioreactors (14), and has been probed to produce carbohydrates for dermocosmetic applications (15). This species of microalgae seems to be a proper candidate to extract compounds to be incorporated into innovative formulations to enhance cosmetic attributes. Thus, we aimed to cultivate *A.*

## Introdução

Os consumidores demandam cada vez mais produtos cosméticos altamente eficazes. As preocupações relacionadas ao envelhecimento da pele aumentam a necessidade do uso regular de dermocosméticos adaptados às necessidades específicas da pele. Ademais, os avanços recentes na ciência cosmética destacaram a importância de incorporar ingredientes novos e sustentáveis, derivados de fontes naturais. Nosso grupo de pesquisa identificou diversos compostos de origem natural com aplicações potenciais em formulações dermocosméticas (1–3). A diversidade de microalgas oferece oportunidades para a obtenção de vários tipos de compostos com alto potencial de aplicação em dermocosméticos. Por exemplo, os pigmentos foram bem descritos devido ao seu potencial antioxidante (4–6). Compostos lipofílicos e hidrofílicos de alto valor agregado, como polissacarídeos estruturais (PS) extraídos da biomassa de microalgas e substâncias poliméricas extracelulares, revelaram aplicações devido às suas propriedades reológicas, bem como, atividades biológicas, como a proteção das células contra danos oxidativos (7–9).

Algumas espécies do gênero *Ankistrodesmus* (Chlorophyceae) foram cultivadas com sucesso para a produção de biodiesel devido ao seu teor lipídico (10–12). Contudo, é importante destacar que certas condições nutricionais e ambientais, como valor de pH, nível de CO<sub>2</sub>, temperatura e intensidade luminosa, são os principais fatores que influenciam as alterações na composição da biomassa durante a fotossíntese. Por exemplo, carboidratos e lipídios são as principais vias concorrentes para a biossíntese de produtos de reserva em espécies de microalgas. Assim, os carboidratos são uma matéria-prima importante na produção de biocombustíveis fermentativos (13). Ademais, os modos de cultivo fototrófico, mixotrófico e heterotrófico foram testados, bem como o cultivo em monocultura ou co-cultivo de *Ankistrodesmus* sp. com *Chlorella* sp. (10). Foi relatada a presença de substâncias poliméricas extracelulares em *Ankistrodesmus falcatus* var. *acicularis* (9).

*A. braunii* foi cultivada com sucesso em fotobiorreatores tubulares (14) e demonstrou potencial para a produção de carboidratos indicados para aplicações dermocosméticas (15). Esta microalga parece ser uma candidata promissora para a extração de compostos a serem incorporados em formulações inovadoras que aprimorem os atributos cosméticos. Assim, o objetivo desta pesquisa foi cultivar *A. braunii*

*braunii* to extract polysaccharides to be incorporated into a dermocosmetic prototype. *In vitro* assay of the antioxidant activity was conducted, and the *in vivo* cutaneous biocompatibility was performed to investigate the safety of a prototype gel containing the *A. braunii* polysaccharides.

## Materials and Methods

### *A. braunii* cultivation, biomass composition, and polysaccharide extraction

*Ankistrodesmus braunii* UTEX 245 sourced from the University of Texas Culture Collection (UTEX), was maintained at  $25 \pm 1$  °C in agar medium. A small aliquot of this culture was used to inoculate 10 units of 10 mL glass tubes, securely sealed, each containing 5 mL Bold medium (16). Fluorescent lamps provided light at the intensity of  $60 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A rotatory shaker (Multitron, Inforts Ht, Switzerland) at  $25 \pm 1$ °C with the inoculum tubes was maintained at 110 rpm for 25 days. Subsequently, a portion of this biomass was exposed for 30 minutes to artificial UVC radiation in Petri dishes. Thus, 10% of these two different biomasses were used to inoculate *A. braunii* in 500 mL Erlenmeyer flasks containing approximately 200 mL Bold medium at the same conditions in the batch mode. An airlift system was employed to ensure circulation of the culture, maintained by an air pump with a flow rate of  $40 \pm 1$  L.h<sup>-1</sup>. The culture pH was maintained at  $7.0 \pm 0.2$  and continuous light intensity was regulated at  $60 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Cultivation temperature was fixed at  $25 \pm 1$ °C. Batch mode with 20 mM NaNO<sub>3</sub> was used for the cultivation experiments. Biomass was harvested at the maximum biomass concentration (X<sub>m</sub>) by centrifugation. The dried biomass was lyophilized and then frozen for further analysis.

The total amounts of lipids (%), proteins (%), and carbohydrates (%) were determined in the dried biomass from each cultivation, as previously described (14,15). From the biomass, in addition to obtaining the PSs, three extracts were prepared with different solvents at 10% w/v: methanol, acetone, and purified water. A ratio of freeze-dried biomass/water (1:45) was maintained for 120 min at 90 °C and under constant agitation at 400 rpm. The mixture was filtered using 0.45 μm pore size. The filtrate was mixed in a separator funnel with absolute ethanol (1:3) and left in a cold chamber (approx. 4 °C). After the complete precipitation of PSs as white crystals,

para extrair polissacarídeos a serem incorporados em um protótipo de dermocosmético. Foi realizado ensaio *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante, e a biocompatibilidade cutânea *in vivo* foi conduzida para investigar a segurança de um gel contendo os polissacarídeos de *A. braunii*.

## Material e Métodos

### Cultivo de *A. braunii*, composição da biomassa e extração de polissacarídeos

A cepa de *Ankistrodesmus braunii* UTEX 245, obtida da University of Texas Culture Collection (UTEX), foi mantida a  $25 \pm 1$  °C em meio de ágar. Uma alíquota reduzida desta cultura foi usada para inocular 10 tubos de vidro de 10 mL, cada um contendo 5 mL de meio Bold (16), devidamente vedados. Lâmpadas fluorescentes forneceram luz com intensidade de  $60 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Um agitador rotativo (Multitron, Inforts Ht, Suíça) foi mantido a  $25 \pm 1$ °C com os tubos de inoculação a 110 rpm por 25 dias. Posteriormente, uma parte dessa biomassa foi exposta por 30 minutos à radiação UVC artificial em placas de Petri. Assim, 10% destas duas biomassas foram usados para inocular *A. braunii* em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo, aproximadamente, 200 mL de meio Bold nas mesmas condições em modo batelada. Um sistema *airlift* foi empregado para garantir a circulação da cultura, mantida por bomba de ar com vazão de  $40 \pm 1$  L.h<sup>-1</sup>. O valor de pH da cultura foi mantido em  $7,0 \pm 0,2$  e a intensidade de luz contínua foi regulada em  $60 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A temperatura de cultivo foi fixada em  $25 \pm 1$ °C. O cultivo em modo batelada foi realizado com 20 mM de NaNO<sub>3</sub>. A biomassa foi coletada na concentração máxima de biomassa (X<sub>m</sub>) por centrifugação. A biomassa seca foi liofilizada e, em seguida, congelada para análises posteriores. As quantidades totais de lipídios (%), proteínas (%) e carboidratos (%) foram determinadas na biomassa seca de cada cultivo, conforme já descrito (14,15).

A partir da biomassa, ademais da obtenção dos polissacarídeos (PSs), três extratos foram obtidos com solventes distintos a 10% m/v: metanol, acetona e água purificada. Uma proporção de biomassa liofilizada/água (1:45) foi mantida por 120 minutos a 90°C sob agitação constante a 400 rpm. A mistura foi filtrada usando filtro com porosidade de 0,45 μm. O filtrado foi misturado em um funil separador com etanol absoluto (1:3) e deixado em câmara fria ( $\pm 4$ °C). Após a completa precipitação dos PSs, como cristais

the mixture was centrifuged. The supernatant was stored for later recovery of the ethanol and the PS solid sample was redissolved in sterile water. After filtration, the PSs were recrystallized using the same initial proportion of ethanol. The suspension was centrifuged, and the crystals were placed in an oven with air circulation at 55 °C for 12 hours (17).

#### *In vitro antioxidant activity*

Antioxidant activity was assessed *in vitro* via the free radical neutralization assay using the stable free radical DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (18). Briefly, 10 µL of each extract (biomass or PS prepared in different solvents) was incorporated into a 990 µL methanol solution of DPPH•. This mixture was incubated for 30 min at room temperature, followed by absorbance readings at 517 nm against a corresponding blank. The *in vitro* antioxidant activity, SA (%), was calculated for each extract and PS according to Equation 1..

$$SA \% = \frac{(A_{DPPH} - A_{sample})}{A_{DPPH}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Where: SA % is the scavenging activity of the free radical;  $A_{DPPH}$  is the absorption of DPPH against the blank, and  $A_{sample}$  is the absorption of the sample or the control against the blank. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as the reference substance. All experiments were performed in triplicate.

#### *Prototype formulation*

Ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer was used as the gelling agent. Two 1.0% w/w ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer dermocosmetics were prepared: 1) blank gel, and 2) gel with 5.0% (w/w) PS from the *A. braunii*.

#### *In vivo trial - Cutaneous biocompatibility*

The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Universidade Lusófona (protocol code 01/2016).

Cutaneous biocompatibility, obtained through the SK and TEWL measurements, was evaluated on 14 healthy male and female subjects, with an average age of  $31.5 \pm 12.6$  years. The inclusion criteria required participants to be non-smokers, have healthy skin with no reported dermatological or circulatory

brancos, a mistura foi centrifugada. O sobrenadante foi armazenado para posterior recuperação do etanol, e a amostra sólida de PS foi redissolvida em água estéril. Após a filtração, os PSs foram recristalizados usando a mesma proporção inicial de etanol. A suspensão foi centrifugada, e os cristais foram colocados em estufa com circulação de ar a 55 °C por 12 horas (17).

#### *Atividade antioxidante in vitro*

A atividade antioxidante foi avaliada *in vitro* por meio do ensaio de neutralização de radicais livres utilizando o radical livre estável DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) [18]. Sucintamente, 10 µL de cada extrato (biomassa ou PS preparado em diferentes solventes) foram incorporados em uma solução metanólica de DPPH• (990 µL). Esta mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, seguida de leituras de absorbância a 517 nm em comparação a um branco correspondente. A atividade antioxidante *in vitro*, SA (%), foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$SA \% = \frac{(A_{DPPH} - A_{sample})}{A_{DPPH}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: SA % é a atividade sequestradora do radical livre;  $A_{DPPH}$  é a absorção do DPPH em relação ao branco, e  $A_{sample}$  é a absorção da amostra ou do controle em relação ao branco. O butil-hidroxitolueno (BHT) foi utilizado como substância de referência. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### *Formulação do protótipo*

O copolímero de acrilóil dimetil taurato de amônio/VP foi utilizado como agente gelificante. Dois dermocosméticos com 1,0% p/p de copolímero de acrilóil dimetil taurato de amônio/VP foram preparados: Gel base (sem adição de ativos); Gel com 5,0% p/p de polissacarídeos (PS) extraídos de *A. braunii*.

#### *Estudo in vivo - Biocompatibilidade cutânea*

O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Lusófona (código do protocolo 01/2016).

A biocompatibilidade cutânea, obtida por meio das medições de SK e TEWL, foi avaliada em 14 participantes saudáveis, do sexo masculino e feminino, com idade média de  $31,5 \pm 12,6$  anos. Os critérios de inclusão exigiam que os participantes fossem não fumantes, tivessem pele saudável,

conditions, and have Fitzpatrick skin types II to V. Exclusion criteria encompassed individuals with active atopic dermatitis, significant sun exposure within four weeks prior to the study, known allergies to the product category used, pregnancy or breastfeeding, and the use of immunosuppressive medications, corticosteroids, antihistamines, retinoids, or anti-inflammatory drugs. All participants provided verbal and written informed consent prior to the study.

The assessment was performed on the inner forearm, with each participant randomly assigned to a control site (untreated) and two treated sites: one for the blank sample and one for the 5.0% *A. braunii* PS gel. Randomized parameters included the selection of either the left or right forearm and either the upper or lower section of the forearm. A prerequisite washout period of one day was enforced, during which the participants refrained from applying any cosmetic products with moisturizers to the designated area.

Environment conditions were controlled at  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  with relative humidity between 40–60%. Baseline measurements of superficial skin (SK) hydration and transepidermal water loss (TEWL) were conducted using the Corneometer® CM825 and the Tewameter® TM 300 (CK Electronics GmbH, Köln, Germany). The test formulations were applied under occlusion for 24 hours using Finn Chambers® epicutaneous patches (Epitest Ltd., Oy, Finland). SK hydration and TEWL were assessed again two hours after the patches had been removed. Results were expressed as ratios of post-application to baseline values to account for individual variability (19,20).

#### Statistical analyses

All measurements were made in triplicate. The overall results were evaluated by ANOVA. The means were considered statistically significant when  $p < 0.05$  (confidence level of 95 %). Tukey's Test was used to compare the means using Minitab® 19 software.

sem condições dermatológicas ou circulatórias relatadas, e apresentassem fototipos II a V de Fitzpatrick. Os critérios de exclusão abrangiam indivíduos com dermatite atópica ativa, exposição solar significativa nas quatro semanas anteriores ao estudo, alergias conhecidas à categoria de produto utilizada, gestantes ou lactantes e aqueles em uso de medicamentos imunossupressores, corticosteroides, anti-histamínicos, retinoides ou anti-inflamatórios. Todos os participantes forneceram consentimento informado, oral e por escrito, antes do início do estudo.

A análise foi conduzida na face interna do antebraço, sendo cada participante aleatoriamente designado a um local controle (não tratado) e dois locais tratados: um com a amostra base (gel sem PS) e outro com o gel contendo 5,0% de PS de *A. braunii*. Os parâmetros randomizados incluíram a escolha entre o antebraço esquerdo ou direito e entre a seção superior ou inferior do antebraço. Foi implementado um período de "washout" de um dia, durante o qual os participantes foram orientados a não aplicar nenhum produto cosmético hidratante na área designada.

As condições ambientais foram controladas a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , com umidade relativa entre 40-60%. As medições iniciais de hidratação superficial da pele (SK) e perda de água transepidermica (TEWL) foram realizadas utilizando o Corneometer® CM825 e o Tewameter® TM 300 (CK Electronics GmbH, Köln, Alemanha). As formulações foram aplicadas sob oclusão por 24 horas, utilizando adesivos epicutâneos Finn Chambers® (Epitest Ltd., Oy, Finlândia). SK e TEWL foram medidas novamente duas horas após a remoção dos adesivos. Os resultados foram expressos como relações entre os valores pós-aplicação e os valores de linha de base, para considerar a variabilidade individual (19,20).

#### Análises Estatísticas

Todas as medições foram realizadas em triplicata. Os resultados gerais foram avaliados por meio de ANOVA. As médias foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (nível de confiança de 95%). O Teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias, empregando o programa Minitab®19.

## Results

### *A. braunii* cultivation, biomass, and polysaccharide extraction

The composition of the biomass was characterized by a predominance of proteins, comprising 61% of the total mass, followed by lipids at 32%, and carbohydrates making up 6%. The extraction methodology detailed in this study successfully yielded white crystalline substances, achieving an extraction efficiency of approximately 4%.

### In vitro antioxidant activity

Three distinct extraction solvents—methanol, acetone, and water—were utilized to evaluate the radical scavenging activity (SA, %) in both biomass and polysaccharides from *A. braunii*. As illustrated in Figure 1, the aqueous extracts exhibited the highest SA values, followed by acetone extracts, and lastly, methanol extracts. Notably, the SA values for the polysaccharides consistently exceeded those obtained for the whole biomass, though they were lower than the control using BHT.

Considering the *A. braunii* aqueous PS superior performance through the DPPH• test, this sample was incorporated in a gel formulation prototype, and its safety profile was established by the cutaneous biocompatibility assay.

### Cutaneous biocompatibility of *A. braunii* gel

Assessment of cutaneous biocompatibility for the *A. braunii* gel was rigorously performed, and the results affirm the gel's suitability for topical application. Upon application of both the blank gel and the gel containing 5.0% polysaccharides from *A. braunii*, there was a sustained maintenance of stratum corneum hydration across all subjects, showcasing the gels' adeptness in preserving skin moisture. Notably, the TEWL measurements depicted in Figure 2(a) further substantiate that neither the blank gel nor the polysaccharide-enriched gel adversely affected the skin's barrier function, as there was no significant increase in water loss compared to the untreated control. This uniformity in hydration and barrier function preservation across different formulations underscores the potential of *A. braunii* polysaccharides in skin care products.

## Resultados

### *Cultivo de A. braunii*, biomassa e extração de polissacarídeos

A composição da biomassa foi caracterizada pela predominância de proteínas, que representaram 61% da massa total, seguidas por lipídios, com 32%, e carboidratos, que constituíram 6%. A metodologia de extração detalhada neste estudo resultou com sucesso na obtenção de substâncias cristalinas brancas, alcançando uma eficiência de extração de aproximadamente 4%.

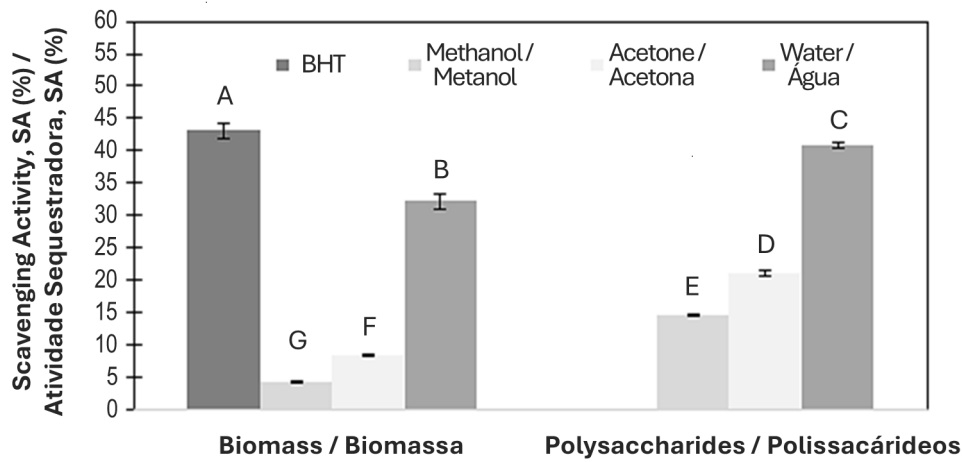
### Atividade antioxidante in vitro

Três solventes de extração distintos — metanol, acetona e água — foram utilizados para avaliar a atividade sequestradora de radicais (SA, %) na biomassa e nos polissacarídeos de *A. braunii*. Conforme ilustrado na Figura 1, os extratos aquosos apresentaram os maiores valores de SA, seguidos pelos extratos em acetona e, por último, pelos extratos em metanol. Os valores de SA dos polissacarídeos excederam consistentemente os obtidos para a biomassa integral, sendo somente inferiores ao controle BHT.

Considerando o desempenho superior dos PSs aquosos de *A. braunii* no teste DPPH•, esta amostra foi incorporada em um protótipo de formulação em gel, e seu perfil de segurança foi estabelecido por meio do ensaio de biocompatibilidade cutânea.

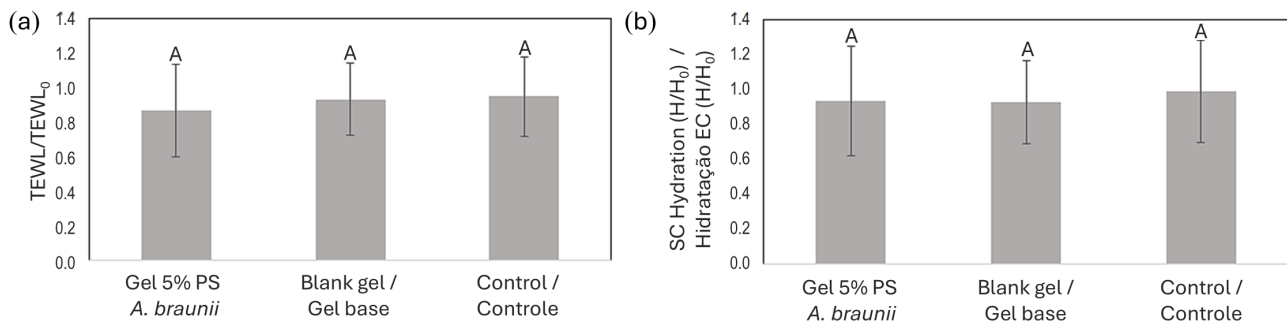
### Biocompatibilidade cutânea do gel de *A. braunii*

A avaliação da biocompatibilidade cutânea do gel de *A. braunii* foi realizada de forma robusta, e os resultados confirmaram a adequação do gel para aplicação tópica. Após a aplicação tanto do gel base quanto daquele contendo 5,0% de polissacarídeos de *A. braunii*, foi observada a manutenção consistente da hidratação do estrato córneo em todos os participantes, demonstrando a eficácia dos géis em preservar a umidade da pele. As medições de TEWL (Figura 2(a)) reforçaram que nem o gel base nem o gel com PSs afetaram negativamente a função de barreira da pele, uma vez que não houve aumento significativo na perda de água em comparação ao controle não tratado. Esta uniformidade na manutenção da hidratação e na preservação da função de barreira entre as diferentes formulações destaca o potencial dos polissacarídeos de *A. braunii* em produtos para cuidados com a pele.



**Figure 1** - Scavenging activity (SA, %) of biomass and polysaccharides from *A. braunii*. The error bars correspond to the SD (n=3). One-way ANOVA followed by the Tukey test was used for comparison between groups. P-values were considered statistically significant when <0.05, with different letters indicating distinct results. BHT = butylated hydroxytoluene.

**Figura 1** - Atividade sequestradora (SA, %) da biomassa e dos polissacarídeos de *A. braunii*. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (SD, n=3). ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valores de p foram considerados estatisticamente significativos quando <0,05, sendo indicados por letras diferentes para resultados distintos. BHT = butil-hidroxitolueno



**Figure 2** - Variation in (a) transepidermal water loss (TEWL); and (b) stratum corneum hydration after application of hydrogel with 5.0% PS from *A. braunii*. The error bars correspond to the SD (n=14). One-way ANOVA followed by the Tukey test was used for comparison between groups. P-values were considered statistically significant when <0.05, with different letters indicating distinct results. PS = polysaccharides.

**Figura 2** - Variação na (a) perda de água transepidérmica (TEWL); e (b) hidratação do estrato córneo após a aplicação do hidrogel com 5,0% de PS de *A. braunii*. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (SD, n=14). ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valores de p foram considerados estatisticamente significativos quando <0,05, sendo indicados por letras diferentes para resultados distintos. PS = polissacarídeos.

## Discussion

Microalgae cultivation in closed system photobioreactors offers more controlled environmental conditions for microalgae development compared to cultivation in open systems, such as open ponds (14). Polysaccharides from some microalgae species are well described in the literature. However, there are no studies detailing the PS composition of *Ankistrodesmus sp.* (21). Polar compounds such as PS can be extracted from natural resources using the proper solvent or a mixture of solvents. Many factors influence extraction yields, such as time, pH, type of solvent, and sample chemical composition, among others (22). Since most microalgae species contain high levels of polar compounds, such as polysaccharides and proteins, the highest level of antioxidant activity recorded in this study using water as a solvent is justified.

Moreover, a study revealed that the role of carotenoids, as antioxidants, is not uniquely responsible for the antioxidant activity of microalgae samples. The presence of phenolic compounds can also increase the antioxidant activity values in some microalgae extracts (23,24), and here, we demonstrated the antioxidant activity of the water-soluble PS from microalgae (25). This protocol is particularly crucial for pinpointing cosmetic ingredients that offer antioxidant benefits. The insights gained from these results critically support the development of dermocosmetic products designed to enhance skin defense mechanisms against oxidative stress, thereby ensuring cellular health and integrity. Furthermore, the higher antioxidant activity may be quite relevant when considering the incorporation of this extract in dermocosmetics, namely for anti-aging products, since this strategy may help slow the skin aging process and signs of aging by including compounds that may act as damage defenders.

*In vivo* skin biocompatibility assays were conducted using non-invasive biophysical techniques. This methodological approach is crucial for identifying dermocosmetic products that are compatible with human skin, highlighting the importance of such studies in ensuring product safety. These tests not only confirm the mildness of formulations but also their suitability for prolonged contact with skin, thereby supporting the potential of new ingredients for everyday cosmetic use. Superficial skin hydration and TEWL are biological variables that depend not only

## Discussão

O cultivo de microalgas em fotobiorreatores de sistema fechado oferece condições ambientais mais controladas para o desenvolvimento das microalgas em comparação aos sistemas abertos, como tanques abertos (14). Os PSs de algumas espécies de microalgas estão bem descritos na literatura, porém, não existem estudos detalhando a composição de PSs em *Ankistrodesmus sp.* (21). Compostos polares, como os PSs, podem ser extraídos de recursos naturais utilizando solventes apropriados ou suas misturas. Diversos fatores influenciam os rendimentos da extração, como tempo, valor de pH, tipo de solvente e composição química da amostra, entre outros (22). Como a maioria das espécies de microalgas contém altos níveis de compostos polares, como PSs e proteínas, isso justifica os altos níveis de atividade antioxidante alcançados utilizando água purificada como solvente.

Ademais, estudos revelaram que os carotenoides não são os únicos responsáveis pela atividade antioxidante das amostras de microalgas. A presença de compostos fenólicos também pode aumentar os valores de atividade antioxidante em alguns extratos de microalgas (23,24). Neste estudo, demonstrou-se a atividade antioxidante dos PSs solúveis em água de microalgas (25). Este protocolo é particularmente crucial para identificar ingredientes cosméticos que oferecem benefícios antioxidantes. Os *insights* obtidos com esses resultados apoiam criticamente o desenvolvimento de produtos dermocosméticos voltados para melhorar os mecanismos de defesa da pele contra o estresse oxidativo, garantindo a saúde e a integridade celular. Ainda, a elevada atividade antioxidante pode ser relevante ao considerar a incorporação deste extrato em dermocosméticos, especialmente para produtos anti-idade, uma vez que esta estratégia pode auxiliar a retardar o processo de envelhecimento da pele e seus sinais, incluindo compostos que atuam como defensores contra tais danos.

Os ensaios de biocompatibilidade cutânea *in vivo* foram realizados utilizando abordagens de técnicas não-invasivas de biofísica. Esta abordagem metodológica é essencial para identificar produtos dermocosméticos compatíveis com a pele humana, destacando a importância de tais estudos para garantir a segurança do produto. Estes testes não apenas confirmam a afinidade das formulações, mas também sua adequação para contato prolongado com a pele, apoiando o potencial de novos ingredientes para uso cosmético diário. SK e TEWL são variáveis biológicas que dependem não apenas



on the skin condition but also on the aging context (26,27). Statistical analysis revealed no significant differences in SK hydration and TEWL between control sites and those treated with *A. braunii*-derived PS gels, affirming the dermatological compatibility of the samples. The consistent preservation of SK hydration and TEWL post-application, mirroring control site values, underscores the efficacy of the compounds in maintaining skin homeostasis. These results indicate that *A. braunii* polysaccharides, when applied topically, effectively support the skin's barrier functions without disrupting normal skin physiology, which is crucial for protecting against pathogens and preventing moisture loss (28,29).

Furthermore, the lack of adverse effects on SK hydration and TEWL parameters strengthens the safety profile of these compounds, making them ideal candidates for inclusion in dermocosmetic formulations. This not only ensures that the final products are safe for extended use but also contributes to the sustainability of the formulations, using natural ingredients that are effective without being invasive to the skin (30).

Therefore, the collected data provide a solid foundation for recommending these microalgae extracts in the development of new skin care products, particularly those aimed at hydration and barrier protection (31).

The strengths of our investigation include an innovative approach to utilizing *Ankistrodesmus braunii* polysaccharides for dermocosmetic applications. The combination of *in vitro* antioxidant assessment with *in vivo* biocompatibility studies enhances the study's relevance and applicability. The use of tubular photobioreactors for microalgae cultivation and standardized methods for evaluating skin hydration and transepidermal water loss add robustness to our findings. Additionally, the ecological perspective of the research, emphasizing the use of a sustainable natural ingredient, aligns with current trends in cosmetic formulation. However, limitations should be acknowledged. The study is limited by the relatively small sample size in the *in vivo* assessments, which may affect the generalizability of the outcomes. Additionally, while the study demonstrates the biocompatibility of the polysaccharide-enriched gel, further investigations into long-term effects, stability, and potential bioavailability of the active compounds in different skin types would strengthen the findings.

da condição da pele, mas, também, do contexto de envelhecimento (26,27). A análise estatística revelou que não houve diferenças significativas na SK e na TEWL entre os locais de controle e aqueles tratados com os géis derivados de PSs de *A. braunii*, confirmando a compatibilidade dermatológica das amostras. A preservação consistente da hidratação da pele e da TEWL após a aplicação, espelhando os valores dos locais de controle, destaca a eficácia dos compostos em manter a homeostase da pele. Estes resultados indicaram que os polissacarídeos de *A. braunii*, quando aplicados topicamente, mantém as funções de barreira da pele sem interromper a fisiologia normal, o que é fundamental para proteger contra patógenos e prevenir a perda da hidratação superficial (28,29).

Além disso, a ausência de efeitos adversos nos parâmetros de SK e TEWL fortalece o perfil de segurança destes compostos, tornando-os candidatos ideais para inclusão em formulações dermocosméticas. Isso garante não apenas que os produtos finais sejam seguros para uso prolongado, mas, também, contribui para a sustentabilidade das formulações, utilizando ingredientes naturais eficazes sem serem invasivos para a pele (30).

Portanto, os dados coletados fornecem base sólida para recomendar esses extratos de microalgas no desenvolvimento de novos produtos para cuidados com a pele, especialmente aqueles voltados para hidratação e proteção da barreira cutânea (31).

Os pontos fortes desta investigação incluem a abordagem inovadora para a utilização de polissacarídeos de *Ankistrodesmus braunii* em aplicação dermocosmética. A combinação da avaliação antioxidante *in vitro* com estudos de biocompatibilidade *in vivo* eleva a relevância e a aplicabilidade do estudo. O uso de fotobiorreatores tubulares para o cultivo de microalgas, conjuntamente com métodos padronizados para avaliar a hidratação da pele e a perda de água transepidermica confere maior robustez aos resultados. Ademais, a perspectiva ecológica da pesquisa, ao enfatizar o uso de um ingrediente natural sustentável, está alinhada com as tendências atuais na formulação cosmética. No entanto, algumas limitações devem ser reconhecidas. O estudo é limitado pelo tamanho relativamente pequeno da amostra nos ensaios *in vivo*, o que pode afetar a generalização dos resultados. Ainda, embora o estudo demonstre a biocompatibilidade do gel enriquecido com polissacarídeos, investigações adicionais sobre os efeitos a longo prazo, a estabilidade e a potencial biodisponibilidade dos compostos ativos em diferentes tipos de pele fortaleceriam os resultados.

## Conclusion

Herein, the *Ankistrodesmus braunii* species was cultivated in a closed photobioreactor system and polysaccharides were extracted and incorporated into a dermocosmetic prototype. The *in vitro* antioxidant scavenging activity indicated that the aqueous PS showed the highest SA values, even compared to biomass, unveiling the relevance of the water-soluble compounds. Consequently, a gel containing 5.0% w/w PS from *A. braunii* was prepared, and the cutaneous biocompatibility of this sample was demonstrated through *in vivo* skin superficial hydration and transepidermal water loss experiments performed in participants.

Overall, there has been an increasing interest in using microalgae as sustainable products for inclusion in dermocosmetics due to the valuable properties of multiple compounds that can be extracted from these species. Nonetheless, much is still to be done due to the vast variety of microalgae strains. This investigation encourages the development of dermocosmetics derived from microalgae, considering, for example, the safety profile of the polysaccharides from *A. braunii* and their antioxidant potential.

## Authors Contributions Statement

Conceptualization, A.L.M.-J. and A.R.B.; methodology, A.L.M.-J.; D.M.R.; J.C.M.d.C. and C.R.; validation, M.V.R.V. and P.R.; formal analysis, A.L.M.-J. and A.R.B.; investigation, A.L.M.-J.; D.M.R. and P.R.; resources, A.L.M.-J.; C.R. and A.R.B.; data curation, C.R.; writing—original draft preparation, A.L.M.-J.; A.R.B. and J.C.M.C.; writing—review and editing, A.L.M.-J., L.G.d.S.C and A.R.B.; visualization, A.R.B.; supervision, C.R. and A.R.B.; project administration, A.R.B.; funding acquisition, A.L.M.-J.; D.M.R.; C.R. and A.R.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Funding

This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 303862/2022-0); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant numbers 2015/11194-6, 2016/22000-0, 2022/09905-5, and 2024/01920-0); and FCT (Foundation for

## Conclusões

Neste estudo, a espécie *Ankistrodesmus braunii* foi cultivada em um sistema de fotobiorreator fechado, e os polissacarídeos foram extraídos e incorporados em um protótipo dermocosmético. A atividade antioxidante sequestradora *in vitro* indicou que os PSs aquosos apresentaram os maiores valores de SA, até mesmo em comparação à biomassa, destacando a relevância dos compostos solúveis em água. Consequentemente, foi preparado um gel contendo 5,0% p/p de PSs de *A. braunii*, cuja biocompatibilidade cutânea foi demonstrada por meio de experimentos *in vivo* de hidratação superficial da pele e perda de água transepidermica realizados com participantes.

De maneira geral, há um interesse crescente no uso de microalgas como produtos sustentáveis a serem incluídos em dermocosméticos, devido às propriedades valiosas provenientes dos diversos compostos que podem ser extraídos destas espécies. No entanto, ainda há muito a ser explorado devido à vasta variedade de cepas de microalgas. Esta investigação incentiva o desenvolvimento de dermocosméticos derivados de microalgas, considerando, por exemplo, o perfil seguro dos polissacarídeos de *A. braunii* e seu potencial antioxidante.

## Declaração Sobre as Contribuições do Autor

Conceituação, A.L.M.-J. e A.R.B.; metodologia, A.L.M.-J.; D.M.R.; J.C.M.d.C. e C.R.; validação, M.V.R.V. e P.R.; análise formal, A.L.M.-J. e A.R.B.; investigação, A.L.M.-J.; D.M.R. e P.R.; recursos, A.L.M.-J.; C.R. e A.R.B.; curadoria de dados, C.R.; redação—preparação do rascunho original, A.L.M.-J.; A.R.B. e J.C.M.C.; redação—revisão e edição, A.L.M.-J.; L.G.d.S.C e A.R.B.; visualização, A.R.B.; supervisão, C.R. e A.R.B.; administração do projeto, A.R.B.; captação de recursos, A.L.M.-J.; D.M.R.; C.R. e A.R.B.. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

## Financiamento

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, número de concessão 303862/2022-0); pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, números de concessão 2015/11194-6, 2016/22000-0, 2022/09905-5 e 2024/01920-0); e pela FCT

Science and Technology), I.P. through national funds under DOI 10.54499/UIDP/04567/2020, DOI 10.54499/UIDB/04567/2020 and DOI 10.54499/EXPL/BTM-MAT/0112/2021 projects attributed to CBIOS.

### **Institutional Review Board Statement**

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Universidade Lusófona's Ethics Committee of School of Health Sciences and Technologies (protocol code 1/2016, 7 December 2016).

### **Acknowledgements**

A.L.M.-J. and D.M.R. are grateful to FAPESP. A.R.B. is thankful to the CNPq, for the Research Productivity Scholarship, and to FAPESP.

### **Conflict of Interests**

The authors declare no conflicts of interest. The editors involved in this manuscript's authorship had no participation in the review or decision process.

(Fundação para a Ciência e a Tecnologia), I.P., através de fundos nacionais, sob os projetos DOI 10.54499/UIDP/04567/2020, DOI 10.54499/UIDB/04567/2020 e DOI 10.54499/EXPL/BTM-MAT/0112/2021 atribuídos ao CBIOS.

### **Declaração do Comitê de Ética Institucional**

O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética da Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona (código do protocolo 1/2016, 7 de dezembro de 2016).

### **Agradecimentos**

A.L.M.-J. e D.M.R. agradecem à FAPESP. A.R.B. expressa sua gratidão ao CNPq, pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa, e à FAPESP.

### **Conflito de Interesses**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse. Os editores envolvidos na autoria desses manuscritos não tiveram participação no processo de revisão ou decisão.

## References / Referências

1. Oliveira, A. C., Morocho-Jácome, A. L., Castro Lima, C. R., Marques, G. A., Bispo, M. O., Barros, A. B., Costa, J. G., Santos de Almeida, T., Rosado, C., Carvalho, J. C. M., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2020). Cosmetics applications. In C. M. Galanakis (Ed.), *Microalgae: Cultivation, Recovery of Compounds and Applications* (pp. 313–338). Academic Press: United States.
2. Morocho-Jácome, A. L., Cezare-Gomes, E. A., Carvalho, J. C. M., Sauce, R., Rosado, C., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2020). UV-screening from microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (pp. 647–657). Elsevier: Netherlands. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00023-3>
3. Morocho-Jácome, A. L., Freire, T. B., de Oliveira, A. C., de Almeida, T. S., Rosado, C., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2020). *In vivo* SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds—A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 20(3), 729–737. <https://doi.org/10.1111/jocd.13609>
4. Cezare-Gomes, E. A., Mejia-da-Silva, L. del C., Pérez-Mora, L. S., Matsudo, M. C., Ferreira-Camargo, L. S., Singh, A. K., & de Carvalho, J. C. M. (2019). Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(3), 602–634. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-02945-4>
5. Morocho-Jácome, A. L., Ruscinc, N., Martinez, R. M., de Carvalho, J. C. M., Santos de Almeida, T., Rosado, C., Costa, J. G., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2020). (Bio)Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(22), 9513–9522. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10936-x>
6. Paliwal, C., Ghosh, T., George, B., Pancha, I., Maurya, R., Chokshi, K., Ghosh, A., & Mishra, S. (2016). Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal Research*, 15, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.017>
7. Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology advances*, 41, 107545. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>
8. De Jesus Raposo, M. F., De Morais, A. M. B., & De Morais, R. M. S. C. (2015). Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*, 13, 2967–3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>
9. Wang, Q., Shen, Q., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, Z., Lei, Z., Shimizu, K., & Lee, D. (2020). Fast cultivation and harvesting of oil-producing microalgae *Ankistrodesmus falcatus* var. *acicularis* fed with anaerobic digestion liquor via biogranulation in addition to nutrients removal. *Science of the Total Environment*, 741, 140183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140183>
10. Mansa, R. F., Sipaut, C. S., Yasir, S., Dayou, J., & Joannes, C. (2018a). Comparative studies of cell growth, total lipid and methyl palmitate of *Ankistrodesmus* sp. in phototrophic, mixotrophic and heterotrophic cultures for biodiesel production. *International Journal of Renewable Energy Research*, 8(1), 438–450.
11. Cobos, M., Paredes, J. D., Maddox, J. D., Vargas-Arana, G., Flores, L., Aguilar, C. P., Marapara, J. L., & Castro, J. C. (2017). Isolation and characterization of native microalgae from the Peruvian Amazon with potential for biodiesel production. *Energies*, 10, 224–240. <https://doi.org/10.3390/en10020224>
12. Yee, W. (2016). Microalgae from the Selenastraceae as emerging candidates for biodiesel production: a mini review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 64. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2023-6>
13. George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T., & Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - a potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, 171, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>
14. Bresaola, M. D., Morocho-Jácome, A. L., Matsudo, M. C., & Carvalho, J. C. M. (2019a). Semi-continuous process as a promising technique in *Ankistrodesmus braunii* cultivation in photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 31, 2197–2205. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01774-0>
15. Morocho-Jácome, A. L., Dapievi Bresaola, M., Carvalho, J. C. M., Nicolai, M., Rosado, C., & Baby, A. R. (2017). Carbohydrates in *Ankistrodesmus braunii* biomass cultivated in tubular photobioreactors. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 14, 242–248. <https://doi.org/10.19277/bbr.14.2.166>
16. UTEX Culture Collection of Algae. (2016). UTEX. UTEX Culture Collection of Algae.
17. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Triratana, P., Loha, V., Tia, S., & Bunnag, B. (2013). Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.046>
18. Falé, P. L., Borges, C., Madeira, P. J. A., Ascensão, L., Araújo, M. E. M., Florêncio, M. H., & Serralheiro, M. L. M. (2009). Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (falso boldo). *Food Chemistry*, 114, 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.015>
19. Peres, D. A., de Oliveira, C. A., da Costa, M. S., Tokunaga, V. K., Mota, J. P., Rosado, C., Consiglieri, V. O., Kaneko, T. M., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2016). Rutin increases critical wavelength of systems containing a single UV filter and with good skin compatibility. *Skin Research and Technology*, 22, 325–333. <https://doi.org/10.1111/srt.12265>
20. Oliveira, C. A. De, Peres, D. D. A., Graziola, F., Chacra, N. A. B., Araújo, G. L. B. De, Flórido, A. C., Mota, J., Rosado, C., Velasco, M. V. R., Rodrigues, L. M., Fernandes, A. S., & Baby, A. R. (2016). Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.016>
21. Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., & Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 34(7), 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
22. Rijo, P., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Simões, M. F., Gomes, A., & Reis, C. (2014). Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology. *Measurement*, 58, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2014.08.045>
23. Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
24. Banskota, A. H., Sperker, S., Stefanova, R., McGinn, P. J., & O'Leary, S. J. B. (2019). Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 31, 309–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1523-1>
25. Marcati, A., Ursu, A. V., Laroche, C., Soanen, N., Marchal, L., Jubeau, S., Djelveh, G., & Michaud, P. (2014). Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by membrane technology. *Algal Research*, 5, 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.03.006>

26. Berardesca, E., Loden, M., Serup, J., Masson, P., & Rodrigues, L. M. (2018). The revised EEMCO guidance for the *in vivo* measurement of water in the skin. *Skin Research and Technology*, 24, 351–358. <https://doi.org/10.1111/srt.12599>
27. Sun, Q., Stantchev, R. I., Wang, J., Parrott, E. P. J., Cottenden, A., Chiu, T. W., Ahuja, A. T., & Pickwell-MacPherson, E. (2019). *In vivo* estimation of water diffusivity in occluded human skin using terahertz reflection spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 12, 2–12. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800145>
28. Yao, Y., & Xu, B. (2022). Skin Health Promoting Effects of Natural Polysaccharides and Their Potential Application in the Cosmetic Industry. *Polysaccharides*, 3, 818-830. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3040048>
29. Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Otero, A., & Coutinho, P. (2021). Application of microalgae and microalgal bioactive compounds in skin regeneration. *Algal Research*, 58, 102395. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102395>
30. Choi, H. Y., Lee, Y. J., Kim, C. M., & Lee, Y.-M. (2024). Revolutionizing Cosmetic Ingredients: Harnessing the Power of Antioxidants, Probiotics, Plant Extracts, and Peptides in Personal and Skin Care Products. *Cosmetics*, 11, 157. <https://doi.org/10.3390/cosmetics11050157>
31. Albuquerque, P. B. S., de Oliveira, W. F., Dos Santos Silva, P. M., Dos Santos Correia, M. T., Kennedy, J. F., & Coelho, L. C. B. B. (2022). Skincare application of medicinal plant polysaccharides - A review. *Carbohydrate polymers*, 277, 118824. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118824>