

**VALORIFICAREA REZIDUURILOR DIN
VINIFICATIE CA ADITIVI ALIMENTARI SI
ANTIOXIDANTI IN INDUSTRIE**

**DEZVOLTARE LA NIVEL DE LABORATOR A UNUI PRODUS
REGENERATOR DERMO-EPIDERMIC, PRIN VALORIFICAREA
UNEI ASOCIERI INOVATIVE INTRE COMPLEXE ACTIVE DIN
DESEURI SI EXTRACTE VEGETALE**

Director proiect : CS I, Prof. Univ. Dr. Natalia Rosoiu

**Membru titular al Academiei Oamenilor de Știință din
Romania**



RAPORT FINAL

noiembrie 2019

Drd. Luiza Mariana Craciun



REZUMATUL PROIECTULUI

Proiectul stiintific „**Dezvoltare la nivel de laborator a unui produs regenerator dermo-epidermic, prin valorificarea unei asocieri inovative intre complexe active din deseuri si extracte vegetale**” este o continuare a proiectului: „**Valorificarea reziduurilor din vinificatie ca aditivi alimentari si antioxidanti in industrie**”, cu scopul de a concretiza cercetarile efectuate in studii aplicative si tehnologice. Se vizeaza dezvoltarea la nivel de laborator a unui produs / produse originale de uz topic, cu adresabilitate in regenerarea pielii. Activitatile ce converg la realizarea acestui obiectiv se refera la selectia componentelor vegetale in concordanta cu sinergismul si complementaritatea actiunii biologice fata de extractul din reziduuri de vinificatie, caracterizarea analitica a compusilor activi, conditionarea unor variante de gel/ crema/ unguent si alegerea tipului de formulare optim, evaluarea compatibilitatii cu pielea umana si a efectului de produs. Realizarea acestui proiect deschide perspectiva concreta a transferului de cunostinte si tehnologie catre un nivel superior de maturitate si de exploatare, cu valorificarea deseurilor de planta si in mod special a celor rezultate din procesul de vinificatie in produs de uz topic eficient in perturbari ale statusului pielii cu larga incidenta (imbatranire, vindecare rani, etc). Proiectul are, de asemenea, in vedere diseminarea rezultatelor la nivel national si international prin comunicari si publicatii stiintifice.

ETAPA II. Studiu de formulare pentru realizarea unui produs de uz topic la nivel de laborator.

CUPRINS

CAPITOLUL I: SELECTIE VARIANTE DE CONDITIONARE COMPATIBILE CU TRATAMENTUL DISFUNCTIILOR CUTANATE

CAPITOLUL III: STUDII DE COMPATIBILITATE SI EFICACITATE LA NIVELUL PIELII

III. 1. METODOLOGII si TEHNICI NEINVAZIVE in DERMATOCOSMETICA

III.2. TESTARE FORMULE DE UZ TOPIC

CAPITOLUL I: EXTRACTE VEGETALE CU POTENTIAL ANTIOXIDANT; COMPLEMENTARITATE STRUCTURA – ACTIVITATE BIOLOGICA PENTRU COMPUSI NATURALI CU APLICATII TERAPEUTICE LA NIVEL CUTANAT

În cadrul acestui capitol ne propunem realizarea unor experimentari confirmatorii privind sinergismul și complementaritatea extractelor vegetale. Testele anterioare de cito-compatibilitate, efect antioxidant multivalent și de stimulare a turn-over-ului celular vor fi completate cu elemente de inducere a regenerării cutanate prin stimularea sintezei de colagen și modularea metaloproteinazelor - enzime degradative ale proteinelor structurale.

a. Evaluarea efectului principiilor active asupra activității enzimice a metaloproteinazelor implicate în procesul de regenerare cutanată

Datorită spectrului larg de specificitate la substrat, MMP-urile contribuie la menținerea homeostaziei multor țesuturi și participă la mai multe procese fiziologice, cum ar fi remodelare osoasă, angiogeneză, imunitate și vindecarea rănilor. Activitatea MMP este strict controlată la nivel de transcripție, activare pro-peptidică și inhibare, de către inhibitorii lor tisulari. Dereglarea activității MMP duce la afecțiuni patologice, cum ar fi artrita, inflamație și cancer, subliniind astfel MMP-urile ca ținte terapeutice promițătoare. Activitatea catalitică a MMP-urilor este puternic controlată la patru niveluri diferite: 1) expresia genelor cu regulare transcripțională și post-transcripțională; 2) localizarea extracelulară și tipul de țesut sau celulă cu eliberare de MMP; 3) activarea pro-enzimelor prin eliminarea pro-domeniului; și 4) inhibarea de către inhibitori specifici (inhibitori tisulari ai metaloproteinazelor matriceale (TIMPs)) și de către inhibitori nespecifici ai proteinazelor. Odată active, MMP-urile pot modula potențialul proteolitic global, în mediul extracelular prin zimogen (pro-forma MMP) activarea și degradarea inhibitorului sau inactivarea altor proteaze.

MMP-2 (gelatinaza A) și MMP-9 (gelatinaza B) sunt responsabile în principal pentru degradarea colagenului denaturat și a gelatinei. De asemenea, pot acționa asupra unor componente ale ECM, inclusiv mai multe tipuri de colagen (I, IV, V, VII, IX, și X), elastină, laminină, aggrecan, fibronectină, vitronectină și mai multe molecule non-ECM, inclusiv pro-TNF, TGF- β , pro-IL-1 β și pro-IL-8. De asemenea, acestea sunt angajate în prelucrarea diverșilor factori pro și antiangiogeni în timpul vindecării rănilor, în special în primele etape ale acestui proces. Ambele gelatinaze sunt sintetizate constitutiv de multe celule, incluzând fibroblaste, keratinocite, celule endoteliale, leucocite polimorfonucleare și monocite. Expresia crescută a MMP-2 poate fi detectată în țesutul conjunctiv, fibroblaste și endoteliu la marginea rănilor acute în toate etapele procesului de vindecare. MMP-2 induce migrația celulelor epiteliale prin clivarea specifică a lamininei -5, o componentă a membranei bazale epiteliale.

MMP-9 contribuie la vindecarea rănilor prin inițierea migrației keratinocitelor și mobilizarea celulelor progenitoare endoteliale din măduva osoasă [Grzela et al.,2016].

Metoda de estimare a concentrației de gelatinaze (MMP2 și MMP9) din mediul condiționat ce se bazează pe capacitatea acestor enzime de a se renatura după migrarea electroforetică în geluri de poliacrilamida-SDS copolimerizate cu gelatina și îndepărtarea SDS-ului prin spălări repetate cu Triton X-100, enzimele exercitându-și astfel activitatea proteolitică asupra substratului copolimerizat pe parcursul a 18 h de incubare la 37°C într-un tampon de dezvoltare.

Extractele vegetale, TES (tescovina din struguri), Gb (extract de galbenele) și Cs (extract de castan), au fost asociate în diferite proporții (v/v) – vezi **tabel 1**:

Tabel 1. Asocierea biocompușilor active **TES, Gb și Cs**

	A1	B1	C1	A2	B2	C2
TES	1	1	9	1	1	9
Gb	9	1	1			
Cs				9	1	1

Evaluarea activității metaloproteinazelor s-a realizat din mediu de creștere colectat în urma tratării keratinocitelor umane normale și fibroblastilor umani normali, cultivate astfel: aderare 24h, tratare 48h în condiții normale de dezvoltare în prezența și absența compușilor investigați, cât și în cadrul unui model de inflamație nespecifică indusă de tratarea cu LPS și PMA (24h pretratare cu extract + 24h stimulare).

a.1. Evaluarea activității MMP 2 și 9 secretate de keratinocite în mediul de cultura extracelular:

Zimogramele sunt scanate și analizate semi-cantitativ prin densitometria benzilor proteice cu activitate enzimatică ce apar ca plaje de liza, iar identificarea tipului de MMP se realizează pe baza maselor moleculare – vezi **figura 1**.

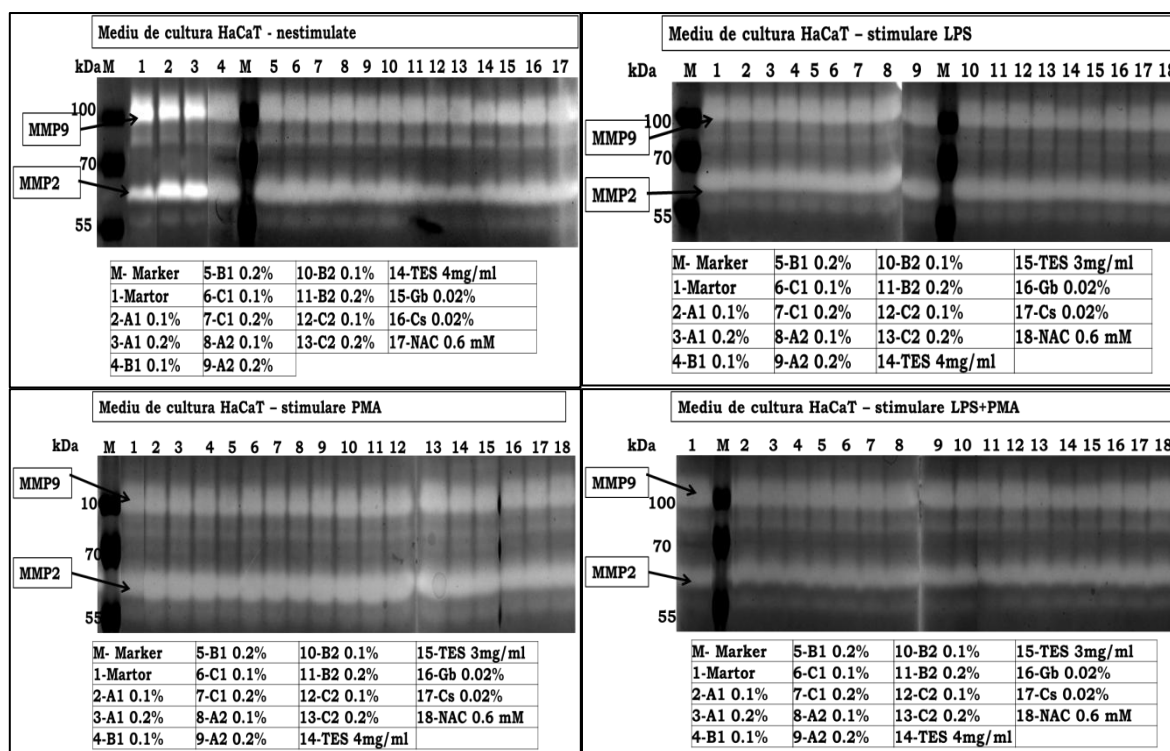


Figura 1. Expresia MMP2 si 9 evaluata prin gelatin-zimografie in prezenta biocomplexelor vegetale

Rezultatele sunt prezentate in **Tabelul 2**, ca procente de variatie a absorbantelor corespunzatoare activitatii enzimaticice a probelor tratate fata de martorul corespunzator.

Tabel 2. Variatia activitatii enzimaticice a MMP secretate de keratinocite tratate cu extractele de interes

Proba	MMP9				MMP2			
	ns	LPS	PMA	LPS+PMA	ns	LPS	PMA	LPS+PMA
Martor	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A1 0.1%	18%	-33%	-33%	9%	31%	-34%	22%	10%
A1 0.2%	26%	-3%	6%	-27%	6%	-5%	45%	10%
B1 0.1%	96%	-28%	-18%	-18%	25%	4%	31%	-26%
B1 0.2%	-27%	-36%	-53%	-2%	-2%	-8%	-26%	-3%
C1 0.1%	-3%	-30%	-27%	-13%	-26%	-1%	-20%	-6%
C1 0.2%	-15%	-31%	-24%	-4%	-8%	-6%	0%	-18%
A2 0.1%	4%	-20%	-36%	11%	13%	-9%	17%	14%
A2 0.2%	-21%	-24%	30%	29%	-23%	20%	67%	13%
B2 0.1%	-7%	-43%	-1%	-5%	-5%	2%	59%	-15%
B2 0.2%	-23%	-51%	-8%	-1%	-48%	-29%	14%	0%
C2 0.1%	-17%	-46%	25%	-25%	-27%	-32%	33%	-4%

C2 0.2%	-21%	-39%	-26%	-8%	-35%	-15%	-12%	-24%
TES 4mg/ml	9%	-58%	-9%	-38%	-29%	-41%	1%	-19%
TES 3mg/ml		-57%	-40%	-21%		-32%	-40%	-9%
Gb 0.02%	2%	-60%	-56%	-19%	-20%	-43%	-45%	-11%
Cs 0.02%	7%	-61%	-16%	-31%	-1%	-44%	-21%	-26%
NAC 0.6 mM	39%	-52%	-14%	-20%	9%	-51%	-5%	27%

Ca si in cazul celulelor epidermice tratate cu extractele bioactive singulare, activitatea enzimatica a MMP 9 si MMP 2 este inhibata in cazul keratinocitelor tratate cu amestecul de TES si Gb in raport de 1:1 - (B1) si 9:1 - (C1), in toate cele trei conditii de stimulare. De asemenea, acelasi efect inhibitor se remarca si in cazul keratinocitelor stimulate proinflamator si bacterian si tratate cu amestecul TES:Cs in raport 1:9 (C2). Rezultatele obtinute, confirma rolul protector al principiilor active testate singular sau asociate, impotriva degradarii proteinelor matricei extracelulare, contribuind la mentinerea integritatii tesutului cutanat, in conditiile unui raspuns inflamator asociat atacului bacterian.

a.2. Evaluarea activitatii MMP 2 si 9 secretate de fibroblasti dermici in mediul de cultura extracelular:

Zimogramele sunt scanate si analizate semi-cantitativ prin densitometria benzilor proteice cu activitate enzimatica ce apar ca plaje de liza, iar identificarea tipului de MMP se realizeaza pe baza maselor moleculare – vezi **figura 2**.

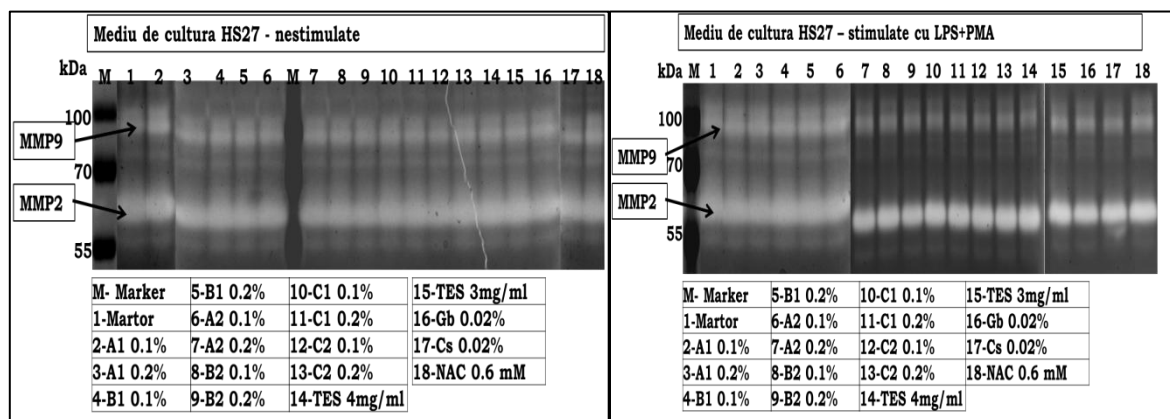


Figura 2. Expresia MMP 2 si 9 evaluata prin gelatin-zimografie in prezenta biocomplexelor vegetale

Rezultatele sunt prezentate in **Tabelul 3**, ca procente de variatie a absorbantelor corespunzatoare activitatii enzimatice a probelor tratate fata de martorul corespunzator.

Tabel 2. Variatia activitatii enzimaticice a MMP secretate de fibroblasti tratati cu extractele de interes

Proba	MMP9		MMP2	
	ns	LPS+PMA	ns	LPS+PMA
Martor	NA	NA	NA	NA
A1 0.1%	9%	-19%	13%	-24%
A1 0.2%	-15%	-21%	-26%	-15%
B1 0.1%	-1%	-18%	-7%	45%
B1 0.2%	-8%	13%	-7%	3%
A2 0.1%	7%	-6%	-14%	4%
A2 0.2%	-8%	-8%	-29%	-21%
B2 0.1%	6%	-28%	-25%	-34%
B2 0.2%	-6%	-16%	-17%	-38%
C1 0.1%	29%	-25%	-8%	1%
C1 0.2%	7%	-17%	-21%	0%
C2 0.1%	33%	-2%	-10%	8%
C2 0.2%	27%	-1%	3%	-3%
TES 4mg/ml	-24%	-24%	-9%	-7%
TES 3mg/ml	29%	-24%	2%	-3%
Gb 0.02%	-10%	-7%	-23%	-9%
Cs 0.2%	26%	-13%	2%	-8%
NAC 0.6 mM	60%	14%	25%	12%

În urma evaluării activității enzimaticice a metaloproteinazelor matriceale secretate în mediul de cultură extracelular de către fibroblaștii dermici în prezența extractelor bioactive, se remarcă următoarele:

- extractele **TES si Cs** acționează în condiții proinflamatoare preponderent asupra MMP 9 în sensul scăderii activității acestora

- Asocierea celor două extracte **TES si Cs în raport 1:1 – (B2)**, induce efect inhibitor pronunțat asupra celor două enzime matriceale implicate în degradarea componentelor structurale din derm;

- asocierea principiilor active din extractele **TES si Gb în raport 1:9 (A1)** generează la nivelul fibroblastilor stimulați proinflamator și bacterian o scădere a activității enzimaticice a metaloproteinazelor matriceale.

b. Evaluarea *in vitro* a efectului de refacere tisulară prin dozarea colagenului intracelular la nivelul fibroblastilor dermici

Fibroblaștii (HS27) au fost cultivati timp de 24 h in placi cu 12 de godeuri in mediu de cultura DMEM, suplimentat cu 10 % ser fetal bovin si 1% antibiotic. Celulele au fost tratate timp de 48h in conditii normale de dezvoltare in prezenta si absenta compusilor investigati, cat si in cadrul unui model de inflamatie nespecifica indusa de tratarea cu LPS si PMA (24h pretratare cu extract + 24h stimulare)..

Mod de lucru: celulele se spăla de doua ori cu PBS rece; urmează fixarea cu metanol la -20°C timp de 20 min si colorare cu Sirius red/Fast green (Chondrex, Gentaur) timp de 30 min, la temperatura camerei, cu agitare usoara. Celulele se spala cu 0.01N HCl si se fotografiază cu microscopul optic. Pentru cuantificarea colagenului total, colorantul reactionat cu colagenul a fost eluat cu 1 ml NaOH 0.1N, iar absorbantele solutiei obtinute au fost citite la spectrofotometru la lungimile de unda de 540 nm (colagen/Sirius Red) si la 605 nm (proteina non-colagenoasa/ Fast Green). Aceasta din urma a fost utilizata pentru normalizarea valorilor concentratiei de colagen, pentru a tine cont de potentialele variatii in numarul de celule cauzate de diferitele tratamente.

Rezultatele reprezentate grafic reprezinta modificarea procentuala a raportului colagen total/proteina totala fata de martorul corespunzator

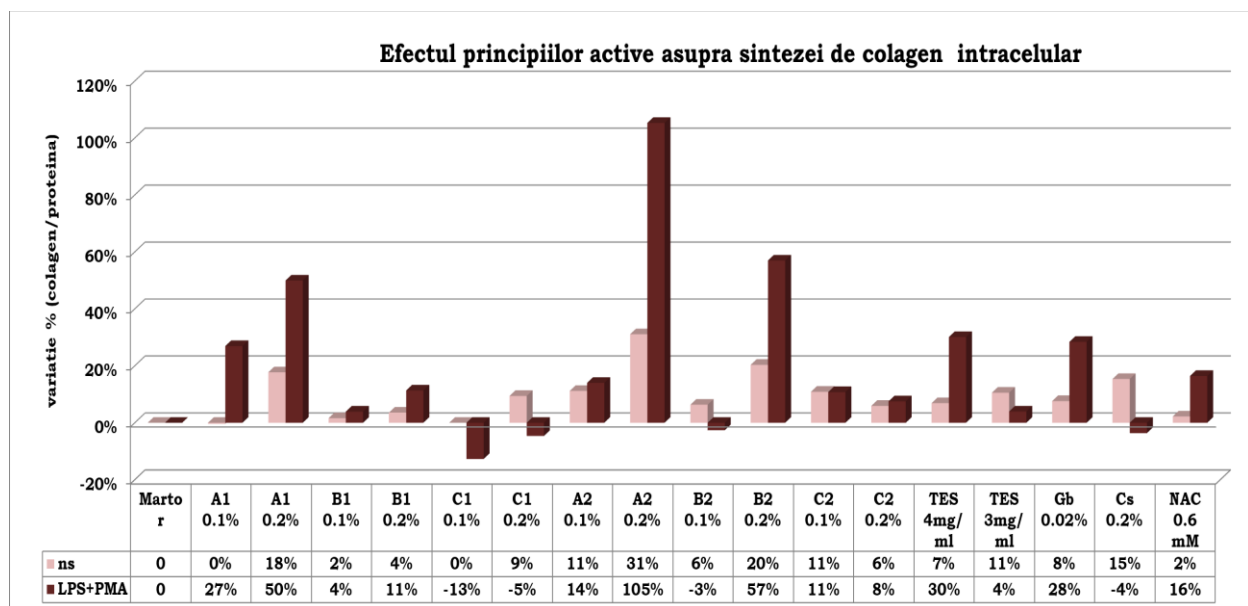


Figura 3. Evaluarea nivelului de colagen biosintetizat de fibroblasti.

Din analiza datelor experimentale se observa modificari semnificative ale biosintezei de colagen dupa 48h de tratament, iar dintre compusii studiati se remarca **extractele TES si Gb, care genereaza o crestere cu 30%, respectiv 28% a cantitatii de colagen intracelular in fibroblastii stimulati cu LPS si PMA.** In cazul fibroblastilor tratati cu amestecul dintre

cele doua extracte, **TES si Gb in raport 1:9 – A1**, se observa o crestere a cantitatii de colagen de pana la 50%. La nivelul fibroblastilor tratati cu extractele **TES si Cs asociate in raport 1:9 – A2, respectiv 1:1, se remarca o crestere considerabila a colagenului intracelular (105% - A2 si 57% - B2)**, demonstrand astfel rolul lor in mentinerea homeostaziei tesutului cutanat si in prevenirea proceselor degenerative.

Avand in vedere rezultatele anterioare privind actiunea antioxidanta a extractului din deseuri de struguri asociat cu extractele de galbenele si castan, precum si potentarea eficacitatii principiilor active complementare din cele trei extracte in regenerarea cutanata, se vor selecta variante de combinatii de principii active care sa reuneasca in mod optim ambele caracteristici:

- **C1_TES:Gb (9:1)** – stimuleaza protectia antioxidanta intrinseca si extrinseca prin activarea glutatationului intracelular si reducerea radicalilor liberi oxigenati;
- **B2_TES:Cs (1:1)** – activeaza intracelular enzimele de aparare antioxidanta, catalaza si superoxid-dismutaza, cu reducerea radicalilor liberi oxigenati.

CAPITOLUL III: STUDII DE COMPATIBILITATE SI EFICACITATE LA NIVELUL PIELII PENTRU FORMULA DE UZ TOPIC DEZVOLTATA

III. 1. METODOLOGII si TEHNICI NEINVAZIVE in DERMATOCOSMETICA

Industria Cosmetica are ca prioritate siguranta consumatorului, legislatia U E fiind conceputa in sensul protejarii acestuia prin caracterizarea toxicologica completa a fiecarui produs sau ingredient nou. Pana in ultima decada testarea pe animale reprezenta singura optiune pentru evaluarea sigurantei produselor cosmetice, dezvoltarea de metode alternative necesitand cercetari amanuntite, pe perioade lungi de timp, bazate pe un spectru larg de cunostinte toxicologice complexe. Metodele alternative de testare presupun trei aspecte: inlocuirea unui test pe animal printr-unul pe model non-animal; reconfigurarea protocolului unui test pe animale in sensul reducerii sau eliminarii stress-ului si suferintei; reducerea numarului de animale necesare unui test. Toate aceste metode sunt validate stiintific de Centrul European pentru Validarea Metodelor Alternative (ECVAM). Astfel, au fost validate modele “in vitro” pt. a inlocui modelul animal de corozione a pielii, care stabileste efectul iritant al ingredientilor, test alternativ pentru stabilirea fototoxicitatii sau a absorbtiei percutanate. Pe langa aceste evaluari initiale ale compusilor nou utilizati in dermatocosmetica si evaluarea toxicologica preliminara, compatibilitatea cu pielea si eficacitatea unui produs se realizeaza prin studii pe voluntari umani, conform urmatoarelor principii generale:

- Studiile se desfasoara in acord cu principiile etice formulate in Declaratia de la Helsinki referitoare la testarile pe subiecti umani, incluzand pastrarea confidentialitatii asupra tuturor inregistrarilor si documentelor;
- Suport stiintific adecvat, protocol detaliat aprobat atat la nivel institutional cat si de o comisie de etica independenta;
- Informatiile despre produsul testat (compozitie, stabilitate fizico-chimica si microbiologica) trebuie sa sustina derularea testului;
- Drepturile, siguranta si confortul subiectilor umani participanti la testari sunt mai presus de orice alte interese ale stiintifice sau sociale; inainte de participarea la astfel de studii, fiecare subiect, cunoscand detaliile tuturor etapelor de derulare a testarilor, trebuie sa-si dea consimtamantul liber exprimat.
- Personalul implicat in derularea studiilor este pregatit profesional si specializat conform normelor si metodologiei de testare;

- Toate informațiile rezultate în urma derulării studiilor se înregistrează, prelucrează și arhivează astfel încât să permită raportarea, interpretarea și verificarea corespunzătoare.

Etica în cercetarea dermatocosmetica: Cele trei principii fundamentale —respectul pentru persoană, beneficiul și justiția — reprezintă bazele eticii în cercetare. Aceste reglementări guvernează întreaga activitate de planificare, aprobare, desfășurare și analiză a cercetării bazate pe subiecți umani. Protecția voluntarilor reprezintă un obiectiv important în derularea testelor. Gradul de risc la care se expun nu depășește importanța umanitară a problemei. Aceste reglementări și recomandări se constituie în norme pentru planificarea, revizuirea, aprobarea și desfășurarea cercetărilor dermatocosmetice cu respectarea considerentelor etice. Experimentele sunt efectuate numai de către persoane calificate științific. În cursul experimentului, subiectul uman trebuie să aibă libertatea de a alege să întreruapă experimentul, dacă acesta a ajuns la starea fizică sau psihică în care continuarea experimentului i se pare a fi imposibilă.

Procesul de informare presupune nu numai luarea deciziei de voluntariat, dar, de asemenea, informații adecvate pentru a lua decizia. Consimțământul informat este bazat pe furnizarea către voluntari de informații relevante de către investigator, înțelegerea informațiilor și competența de a lua decizia. În consimțământ s-a stabilit că participarea este absolut voluntară. Refuzul de a participa la cercetare sau dorința de a se retrage din studiu nu va duce la sancțiuni sau pierderi de beneficii la care participantul este îndreptățit altfel. Înaintea unui studiu pe voluntari umani sănătoși, se va analiza documentația științifică din literatura de specialitate, se va alege un eșantion adecvat de subiecți și se vor utiliza tehnici instrumentale de investigație consacrate. Vor fi respectate confidențialitatea datelor studiului și protecția datelor personale, precum și normele GCP (Good Clinical Practice) - un standard internațional de calitate în domeniul etic și științific pentru proiectarea, realizarea, înregistrarea și raportarea studiilor care implică subiecți umani.

Principalele **metode de evaluare** sunt:

- **Metode de evaluare a toleranței cutanate:** Determinarea potențialului iritant, a potențialului sensibilizant și a potențialului alergologic

- **Metode de evaluare a eficacității:** Determinarea unor parametri fiziologici relevanți: hidratarea, sebumetria, pH-ul, melanina, eritemul, elasticitatea, evaporarea transepidermală a apei, a microreliefului pielii, etc. Pe lângă toate acestea, cercetări avansate au implementat în testarea dermatocosmetica și tehnici din practica medicală: evaluări Laser Doppler privind microcirculația sanguină superficială și tehnici ecografice de scanare cu ultrasunete de înaltă frecvență pentru evaluarea structurilor dermo-epidermice.

DETERMINAREA TOLERANTEI CUTANATE - POTENTIALUL IRRITANT

Tehnica presupune aplicarea de pansamente ocluzive ("patch-uri") cu produsul de investigat, in anumite zone anatomice bine definite (umar sau spate) timp de 24h.

Evaluarea potentialului iritant se face:

Vizual – se observa inrosirea si/sau uscarea pielii si se cuantifica prin scoruri reglementate de Colipa ; **Instrumental** – se fac masuratori de evaporare transepidermala a apei (prin tewametrie), de Laser-Doppler flowmetrie sau se determina cu mexametrul eritemul aparat.

Reactia se monitorizeaza imediat, dupa 10 min., dupa 30 min., si 2h de la indepartarea pansamentului ocluziv.

POTENTIALUL SENSIBILIZANT- Tehnica presupune aplicarea de pansamente ocluzive ("patch-uri") cu produsul de investigat, in anumite zone anatomice bine definite (umar sau spate) cate 23h.pe zi timp de 21zile. In fiecare zi se indeparteaza pansamentul ocluziv si se evalueaza efectul in decursul unei ore, dupa care se reaplica "patch-ul" exact in aceeasi zona pentru inca 23h.

Criteriu de excludere: maladii dermatologice care pot interfera cu evaluarea.

Se aplica in paralel cu substanta testata si patch-uri placebo si patch-uri control pozitiv cu un iritant cunoscut (0.1% lauril sulfat de sodiu)

Evaluarea potentialului iritant se face vizual sau instrumental, similar ca in cazul evaluarii potentialului iritant. Reactia se monitorizeaza imediat, dupa 10 min., dupa 30 min., si 2h de la indepartarea pansamentului ocluziv.

POTENTIALUL ALERGOLOGIC- Tehnica presupune aplicarea de pansamente ocluzive ("patch-uri") cu produsul de investigat, in anumite zone anatomice bine definite (umar sau spate) in cadrul a trei perioade secventiale: **faza de inductie:** aplicarea substantei de testat se face in aceeasi zona de 3 ori pe saptamana, timp de 3 saptamani(in total 9 aplicatii). La fiecare indepartare a "patch-ului" se evalueaza reactia pielii prin sistemul de scoring reglementat; **faza de repaus:** urmeaza imediat dupa cea de inductie, timp in care nu se aplica nimic in zonele definite anterior; **Faza de schimbare:** Se aplica un nou "patch", intr-o alta zona a pielii, timp de 48h. Reactia se monitorizeaza de catre un observator neutru dupa 30 min., 24h., 48h., 72h.de la indepartarea pansamentului.

Evaluarea potentialului alergologic se face vizual sau instrumental, similar ca in cazul evaluarii potentialului iritant.

METODE DE EVALUARE A EFICACITATII

DETERMINAREA HIDRATARII - Se realizeaza instrumental, cu corneometrul.

Principiul metodei: masurarea capacitatii. Apa creste capacitatea unui condensator fata de un condensator cu vid ($C=\epsilon S/d$). Constanta dielectrica ϵ a apei este 81, comparativ cu a altor substante <7 si a vidului de 1. Modificarile capacitatii datorate schimbarilor constantei dielectrice se traduc apoi in nivele diferite de hidratare. Corneometrul masoara continutul de apa din stratul superficial epidermal pana la o adancime de 0,1 mm.

Continutul de apa din stratul corneum (SC) depinde de: umiditatea exterioara, capacitatea epidermei de a inlocui apa pierduta transepidermal si capacitatea intrinseca de mentinere a apei din SC (care depinde de structura si compozitia SC, in particular de continutul de amino acizi). Hidratarea poate creste prin actiunea unor produse care inhiba evaporarea apei de la suprafata pielii sau prin produse care, fiind absorbite adanc in piele, isi elibereaza elementele de hidratare. Patologii ale pielii care scad continutul de apa: dermatite atopice, eczeme, psoriazis, xeroza senila, ihtioza ereditara.

DETERMINAREA SEBUMETRIEI- Se realizeaza instrumental, cu sebumetrul

Principiul metodei: se determina fotometric absorbanta unei fasii de plastic speciala impregnata cu sebum, care devine transparenta datorita lipidelor. Se pot masura valori ale sebumului cuprinse intre 50 si 300 μ g / cm². Peste aceste valori fasia de plastic este suprasaturata de excesul de sebum si apar erori de masurare, iar sub 50 μ g / cm² nu exista liniaritate intre valorile afisate si continutul de sebum. Cantitatea de sebum de la suprafata pielii depinde de zona anatomica, fie datorita densitatii glandelor sebacee, fie datorita nivelului lor de activitate. Sebumul lubrefiaza si protejeaza pielea prevenind uscarea ei si iritarea membranei. Cantitatea de sebum atinge un maxim la pubertate, dupa care descreste continuu. Un nivel scazut al lipidelor din piele produce aparitia tenului uscat in ultimii ani de viata.

DETERMINAREA pH-ului pielii -Se realizeaza instrumental, cu pH-metrul

Principiul metodei: masurarea concentratiei ionilor de [H] cu un electrod de sticla cu baza plata (metoda standard), aplicat perpendicular pe suprafata de testat. Valoarea pH-ului pielii se datoreaza substantelor solubile in apa continute de stratul corneum, transpiratiei si secretiei de sebum, precum si eliminarii acidului carbonic. Valoarea optima a pH-ului pielii este de 5.5 la femei si 5 la barbati. Valoarea medie a pH-ului se afla in domeniul acid aparand pielea de atacul bacterian si fungic. Un pH mai mare va diminua functia protectiva a pielii.

Valoarea pH-ului depinde de zona testata si de diferiti factori exogeni(utilizarea sapunurilor, a detergentilor si a fardurilor).Valoarea pH-ului nu depinde de temperatura si umiditate.In evaluarile de eficacitate, produsele cosmetice testate nu trebuie sa afecteze valoarea normala a pH-ului pielii. Ele trebuie sa o restabileasca in cazurile in care aceasta a fost afectata.

DETERMINAREA melaninei - Melanina este pigmentul de culoare al pielii. Scopul producerii ei de catre organism este de a proteja acizii nucleici celulari. Supraexpunerea la radiatia solara produce degradarea acizilor nucleici, a membranelor celulare, a proteinelor (elastina si colagen) si induce inflamatia. Toate acestea conduc la hiperpigmentare, imbatranire prematura si cancer. Tipul de piele si gradul de pigmentare influenteaza procesele epidermale si viteza de refacere. Cu cat pielea este mai pigmentata, cu atat bariera epidermala este mai functionala si capacitatea de refacerea mai buna (cazul populatiilor de culoare).

Determinarea melaninei se realizeaza instrumental, cu Mexametru.

Principiul metodei –masurarea absorbantei pielii la doua lungimi de unda, specifice pigmentilor melaninici. Sonda aparatului emite radiatia la lungimile de unda stabilite, iar un fotodetector masoara radiatia reflectata de piele.

Acest tip de test se utilizeaza pentru evaluarea eficientei unor produse cu efecte “ de albire” sau “de bronzare” sau cu efect de protectie impotriva radiatiilor UV .

DETERMINAREA eritemului- Se realizeaza instrumental, cu Mexametru.

Principiul metodei –masurarea absorbantei pielii la doua lungimi de unda, una specifica hemoglobinei, iar cealalta (caracteristica bilirubinei) - stabilita pentru a evita interferentele.

Sonda aparatului emite radiatia la lungimile de unda stabilite, iar un fotodetector masoara radiatia reflectata de piele.

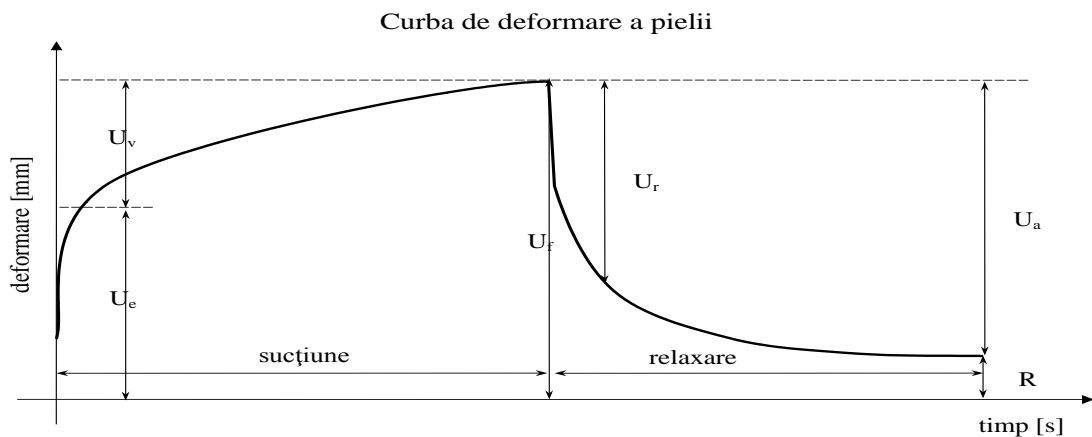
Acest tip de test se utilizeaza in special in cazul testelor de toleranta cutanata a produselor cosmetice, dar si pentru evaluarea eficientei unor produse “cu efect calmant”.

DETERMINAREA ELASTICITATII PIELII

Se realizeaza instrumental, cu ajutorul **Cutometrului**

Principiul metodei – se bazeaza pe succiune si elongatie. Dispozitivul genereaza o presiune negativa intre 20 si 500mbar care “absoarbe “ zona de piele pe care se aplica.

Pentru masurarea proprietatilor mecanice ale epidermei se folosesc sonde cu o deschidere de 2 mm diametru si pentru derma si hipoderma cu 10mm diametru.



Semnificatia parametrilor obtinuti din curba de deformare a pielii:

Suctiune: U_e -alungirea imediata (componenta elastica masurata la 0,1s)

U_v -alungirea intarziata (componenta plastica)

U_f -alungirea finala

Relaxare: U_r -revenirea imediata (componenta elastica; $U_r \sim U_f$ la pielea elastica)

U_a -relaxarea finala

R -deformarea reziduala de la sfarsitul ciclului de masura

$U_a/U_f =$ **elasticitatea grosiera** (relaxarea finala fata de alungirea totala)

$U_r/U_e =$ **elasticitatea neta** (contine doar componentele elastice de la suctiune si relaxare)

$U_r/U_f =$ **elasticitatea biologica** (componenta elastica de la relaxare fata de alungirea totala)

$U_v/u_e =$ **raportul vascoelasticitatii** (componenta plastica fata de componenta elastica, ambele la suctiune)

$R_8 =$ **partea vascoasa** adica, aria de sub ramura de suctiune a curbei de deformare

Parametri absoluti: $U_e, U_v, U_f, U_r, U_a, R$ - sunt influentati de grosimea pielii

Parametri relativi: $U_e/U_f, U_r/U_f, U_v/U_e$ - sunt independenti de grosimea pielii si se pot compara intre subiecti, regiuni anatomice si timpi diferiti.

U_e si U_f reprezinta alungirea pielii care depinde de alungirea fibrelor de collagen si elastina si este invers proportionala cu grosimea si/sau rigiditatea pielii

U_v si U_v/U_e reprezinta partea vascoelastica a deformarii si s-a atribuit deplasarii fluidului interstitial prin reseaua de fibre (fluidul contine apa si glucozaminoglicani-foarte vascosi). Cresterea valorii celor doi este legata de hidratarea pielii deoarece scade vascozitatea fluidului interstitiala ca urmare a cresterii continutului de apa.

Ur, Ua/Uf si Ur/Uf masoara capacitatea pielii de a reveni la starea de dinainte de deformare si, sunt legati de functia fibrelor elastice. Modificarile degenerative din retea de fibre duc la scaderea acestor parametri.

Elasticitatea pielii depinde de: varsta, sex (barbatii au pielea mai elastica), status fiziologic (boli de piele sau interne), zona anatomica, stil de viata (alcool, tutun, hrana, somn), conditii de mediu (temperatura, umiditate), expunere la radiatii solare. Modificarile de elasticitate se urmaresc cu precadere in testele de eficienta ale produselor tip anti-ageing.

DETERMINAREA EVAPORARII TRANSEPIDERMALE DE APA

Se realizeaza instrumental, cu **Tewametrul**

Principiul metodei –estimarea gradientului vaporilor de apa ($c_o - c_i$) dintr-o camera deschisa, bazata pe legea difuziei a lui A. Fick ($J = kD(c_o - c_i)/h$). Transportul transepidermal consta in traversarea moleculelor prin stratul corneum (SC) intact. Exista doua posibilitati de traversare: intracelular si intercelular (prin si printre corneocite). Calea aleasa depinde de coef. de partitie k : substantele hidrofile prefera calea intracelulara in timp ce substantele lipofile - calea intercelulara. Multe molecule traverseaza SC prin ambele cai. Metoda reprezinta o evaluare indirecta a integritatii stratului hidrolipidic responsabil de functia de bariera a pielii. Exista o difuzie continua a apei din corp spre stratul corneum si de acolo spre mediul inconjurator. Nivele mici de apa pierduta transepidermal inseamna o functie mai buna de bariera a pielii si o pierdere mai mica a hidratarii naturale. Functia de bariera este perturbata usor de problemele mecanice (leziuni) sau atac chimic. Masuratorile sunt afectate de un numar mare de variabile: temperatura, umiditatea, curentii de aer; emotiile puternice, efortul fizic. Masuratorile TEWL sorteaza ingredientele cu efecte benefice asupra functiei de bariera si monitorizeaza in vivo, pe piele, efectele tratamentelor topice.

Riscurile care deterioreaza bariera si cresc TEWL: spalare manuala frecventa cu detergenti, expunere la alte substante chimice, climatul rece sau uscat, varsta, dermatozele.

Mentinerea si restaurarea evaporarii transepidermale a apei in limite normale permite pielii sa realizeze si sa optimizeze: rezistenta la factorii patogeni, echilibrul hidratare / deshidratare, impiedicarea influxului substantelor chimice nedorite, impiedicarea stimulării excesive a raspunsului inflamator al stratului corneum.

Se pot testa: produse cosmetice de catifelare, reparare a pielii, cu efect protector impotriva radiatiilor UV; reducerea reactiilor iritative. Semnele clinice frecvente pentru o pierdere crescuta a apei transepidermale sunt: descuamarea, lipsa catifelarii, inflamarea, inrosirea, craparea si fisurarea.

DETERMINAREA MICRORELIEFULUI PIELII

Se realizeaza instrumental, cu **Skin-visiometrul**. La suprafata pielii se intersecteaza linii primare si secundare formand un “microrelief” asemanator cu o harta topografica. Acesta reprezinta un foarte bun indicator al procesului de imbatranire a pielii, modificari in structura sa fiind strans legate de degradarea fibrelor elastice din derma. Liniile primare sunt caracteristice pentru fiecare persoana, varsta si zona anatomica.

Principiul metodei –transmiterea luminii printr-o replica subtire de silicon albastru (absorbanta culorii albastre este cunoscuta). Replica impregneaza microrelieful pielii din zona de analizat (antebrat), fiind o imagine “negativa “ a acestuia. Lumina penetreaza replica si este absorbita diferit in functie de grosimea acesteia. Dupa selectarea ariei de analizat din cadrul imaginii obtinute, softul calculeaza parametri de rugozitate R1-R5 in functie de care se apreciaza evolutia microreliefului pielii. **Skin-visiometrul** nu masoara riduri ce depasesc 360 µm adancime datorita limitarii grosimii replicii. Metoda nu se poate folosi la analizarea ridurilor fetei (laba gastei, ridurile fruntii si colturilor gurii), cu adancimi >500µm. Pentru ridurile fetei se foloseste **Visioscopul** cu sursa de lumina UV sau Color cu lumina alba.

Factori care influenteaza rugozitatea pielii: radiatiile UV solare; stilul de viata (alcool, medicamentele, hrana, somnul), produsele farmaceutice si cosmetice;

Aplicatiile metodei: studii de eficacitate ale produselor anti-ageing; monitorizarea efectelor detergentilor, produselor tip “peeling”;dermatologie.

EVALUAREA TESUTULUI CUTANAT PRIN TEHNICI ECHOGRAFICE - scanare cu ultrasunete de inalta frecventa cu aplicabilitate pentru tesut cutanat. -Dermascan C / CORTEX, Danemarca. Acesta metoda furnizeaza imagini in sectiune, adancimea scanarii fiind in functie de frecventa sondei folosite (ex. 20MHz si rezolutie de 60-150microni - adancime de 13mm; 20MHz si rezolutie de 60-200 microni - adancime de 23mm; 50MHZ, rezolutie de 25-60 microni – adancime de 3mm). Pentru aplicatiile curente de investigare la nivel dermo-epidermic se utilizeaza sonda cu frecventa de 20MHz. Pentru o rezolutie speciala si o imagine mai clara a structurilor fine (ex. formarea unghiilor) se utilizeaza sonda de 50 MHz. Tehnica este neinvaziva, bazata pe principiul unei echografii clasice si furnizeaza informatii despre tesutul cutanat si articular, dupa cum urmeaza:

- Degradarea / refacerea colagenului articular (*Phys. Med. Biol.* **50** (2005) 3221–3233; *OsteoArthritis and Cartilage* (2006) *14*, 258e263)
- Fibrele de collagen din matrixul dermic ca rezultat al foto-imbatranirii, precum si reversibilitatea procesului in cazul unui tratament eficace.

- Masurarea grosimii tesutului subcutanat (cu aplicabilitate in studii anti-celulitice)
- Masurarea grosimii epidermei, dermei (cu aplicabilitate in studii anti-ageing – in imbatranirea cronologica epiderma si derma devin mai subtiri, sau pentru produse keratolitice – se urmareste micsorarea dimensiunilor stratului corneum)
- Analiza reactiilor alergice si iritative prin vizualizarea edemelor si a infiltratelor inflamatorii (masurarea dimensiunilor ariilor hiporefectante) – (*ActaDerm. Vener1992, 175, 9-13*)
- Reactivitatea cutanata la alergeni (ex. aplicatii pentru patch-teste)
- Atrofia cutanata in urma unui tratament medicamentos (ex. corticosteroizi)
- Analiza evolutiei cheloizilor, a nevi-lor sau chiar a tumorilor de piele

Exemple de imagini echografice:

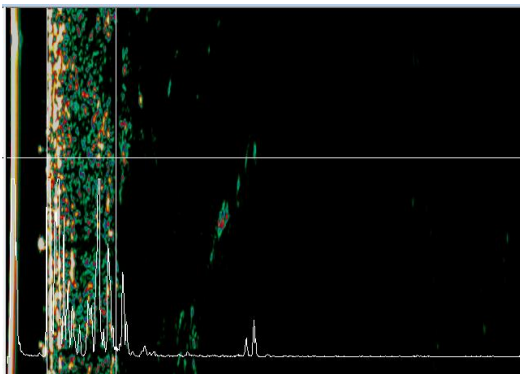


Fig. 1. Scanare modul A, derm normal

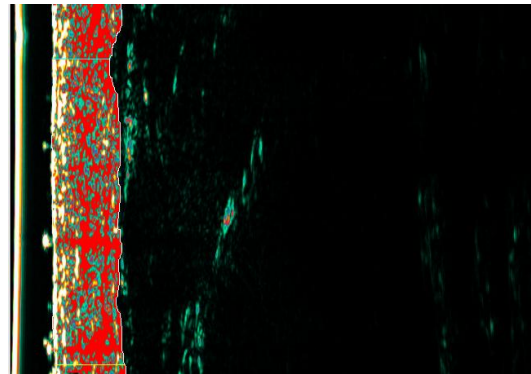


Fig. 2. Scanare modul B, derm normal

- **Degradarea si refacerea colagenului:**

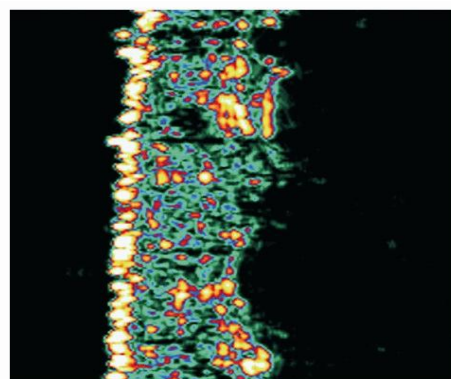
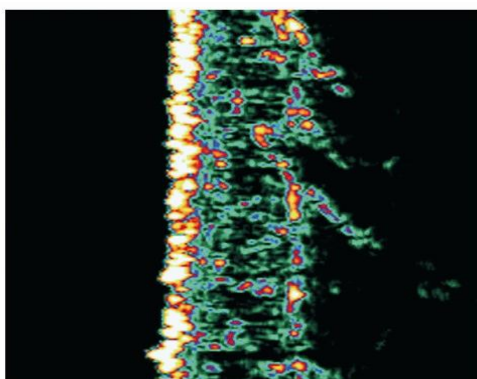


Fig. 3. Stânga (înainte de tratament): interfața cu tesutul subcutanat apare ca o linie intrerupta neregulata; structurile negre sunt celulele de grăsime și lichid limfatic. Dreapta (după terapie): tesutul a devenit mult mai compact indicând o consolidarea țesutului conjunctiv; inter-spatiile hipocogenice (negre) au fost reduse.

TESTAREA MICROCIRCULATIEI SANGUINE in evaluarile dermatocosmetice prin SISTEMUL Laser Doppler PeriFlux 5000

Aportul sanguin la nivelul pielii este realizat de o retea de arteriole, capilare si venule, testarea microcirculatiei sanguine fiind de o deosebita importanta in cosmetologie in cuantificarea factorului de protectie solara, iritatiilor de diferite cauze, inflamatiilor si edemelor periferice.[*Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2002 Nov-Dec;15(6):442-56.EEMCO guidance for the measurement of skin microcirculation.Berardesca E, Lévêque JL, Masson P; European Group for Efficacy Measurements on Cosmetics and Other Topical Products (EEMCO Group).*]Masurarea microcirculatiei sanguine se poate face in principal prin tehnica de cuantificare a proprietatilor optice si termice ale pielii datorate perfuzarii sanguine. Cand radiatia laser este directionata prin tesut, apar fenomenele de reflexie, transmisie, absorbtie si imprastiere. Conform principiului Doppler, radiatia imprastiata de particulele in miscare (in cazul fluxului sanguin:eritrocitele) are o frecventa diferita fata de structurile nemiscate care raman la aceeasi frecventa. O parte din aceasta radiatie imprastiata este colectata de catre fibrele optice si transmisa la un fotodetector. Foto-curentul rezultat este procesat electronic pentru a produce semnalul de tip Doppler. Diferenta de frecventa Doppler (intre radiatia imprastiata de particulele in miscare si cea a structurilor nemiscate) este o masura a vitezei fluxului sanguin. Pe langa aplicatiile cosmetologice descrise mai sus, aplicatiile clinice ale tehnicii Doppler sunt legate de microangiopatii diabetice, maladii vasculare periferice, chirurgie plastica si post-arsura, maladii dermatologice. Microcirculatia cutanata este un proces dinamic ce poate fi influentata de diversi factori (ritmul circadian, pozitia pacientului, activitatea fizica /psihica, temperatura, consumul de substante care actioneaza asupra tonusului vascular: nicotina, cafeina, medicamente). Se recomanda asocierea tehnicii Laser Doppler cu cea a echografiei neinvasive (cu echipamentul Dermascan), in evaluari de tip dermatocosmetic, de exemplu pentru demonstrarea eficacitatii unui tratament pentru edeme periferice (simptom de „picioare grele”). Corelarea celor 2 tehnici se bazeaza pe completarea imaginilor echografice si a aprecierii dimensiunilor edemelor cu date numerice privind functia vasculara (Unitati de perfuzie sanguina) esentiala in astfel de patologii. [*Hindawi Publishing Corporation, Dermatology Research and Practice, Volume 2009, Article ID 547039*]

III.2. TESTARE FORMULE DE UZ TOPIC

Evaluarea compatibilitatii cu pielea umana si a efectului de produs au fost realizate pentru cele doua produse formulate anterior:

- **Crema de protectie antioxidanta (CPAO)**, destinata tenului normal ca preventie a agresiunii factorilor de mediu nocivi: fluctuatii de temperatura, radiatii UV, etc. *Are in compozitie extractele TES si galbenele (Gb) in proportie 9:1.*

- **Crema de maini regeneratoare (CMR)**, destinata ingrijirii mainilor si refacerii in urma agresiunii chimice (detergenti, etc), a deshidratarii, etc. *Are in compozitie extractele TES , galbenele (Gb) si castan (Cs), in proportie 9:1:9.*

A. TESTAREA TOLERANTEI CUTANATE pentru EVALUAREA COMPATIBILITATII CU PIELEA UMANA

Tehnica presupune aplicarea unui pansament ocluziv care amplifica potentialul iritant al unor produse cosmetice, fiind utilizata pentru a monitoriza posibilele reactii adverse la nivel cutanat si pentru a obtine dreptul de revendicare a claimului « testat dermatologic ».

1. MATERIALE

- pansamente ocluzive –tip “camere - patch” IQ ultra;
- marker UV pentru piele;
- lampa UV
- produsul cosmetic de testat;
- aplicator;
- servetele de hartie.

2. VOLUNTARI, CRITERII DE INCLUDERE / EXCLUDERE

Studiile se desfasoara in acord cu principiile etice formulate in Declaratia de la Helsinki referitoare la testarile pe subiecti umani, incluzand pastrarea confidentialitatii asupra tuturor inregistrarilor si documentelor. Drepturile, siguranta si confortul subiectilor umani participanti la testari sunt mai presus de orice alte interese ale stiintifice sau sociale. Inainte de participarea la astfel de studii, fiecare subiect si-a dat consimtamantul liber exprimat, cunoscand detaliile tuturor etapelor de derulare a testarilor. **Criteriu de includere** : voluntari ce au fost informati de particularitatile testului si au semnat consimtamantul, majori, rasa caucaziana, clinic sanatosi ; evaluarea starii de sanatate se va face anterior testarii, de catre un medic, observatiile fiind cuprinse in fisa personala a subiectului ; **Criteriu de excludere**:

maladii dermatologice care pot interfera cu evaluarea, sarcina, participarea la alte studii simultane sau la un interval scurt de timp (mai mic de doua luni), tatuaje, arsuri solare, cicatrici in regiunile testate, tratament medicamentos (in special cortizonic). Participantii vor fi exclusi din lotul de testare daca nu vor urma instructiunile investigatorului, se vor imbolnavi sau accidenta in timpul derularii testului, nu vor mai dori sa participe la studiu. La manifestarea oricaror reactii adverse severe se va intrerupe testarea si se va administra tratament specific.

3. MOD DE LUCRU

Metodologia de testare presupune desfasurarea urmatoarelor etape:

- Se realizeaza randomizarea produselor de testat, avand in vedere ca pentru fiecare subiect se folosesc cate 3 placi cu pansamente ocluzive, fiecare avand cate 10 camere de aplicare ; fiecare produs de testat se va aplica in triplicat.
- se aplica produsul de testat, conform randomizarii stabilite, in fiecare din cele 10 camere de testat o cantitate fixa de produs;
- se aplica pansamentul ocluziv (placa de testare cu cele 10 camere cu produse) pe zona de piele marcata cu marker-ul UV pentru piele (umar sau partea de sus a spatelui);
- se pastreaza pansamentul ocluziv timp de 24h, fara sa se umezeasca, perioada in care se tin sub observatie posibilele reactii adverse;
- dupa 24h se indeparteaza pansamentul ocluziv; produsul va fi indepartat de pe piele prin spalare sau stergere, fara frecare;
- se noteaza reactiile adverse aparute la nivel cutanat (eritem, uscaciune si edem) prin scoruri stabilite conform reglementarilor COLIPA si mentionate la punctul 5;
- reactia se monitorizeaza imediat, dupa 1 ora, respectiv 24h de la indepartarea pansamentului ocluziv; evaluarea se va face de catre personal specializat, neutru, sub aceeaasi sursa de lumina.

4. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Evaluarea potentialului iritant pentru produsul cosmetic de testat se realizeaza: **vizual** – se evalueaza inrosirea si/sau uscarea pielii pe o scala conform scorurilor Colipa.

Scala de evaluare este urmatoarea:



Source: Spiewak R. Patch testing for contact allergy and allergic contact dermatitis. *Open Allergy J* 2008; 1: 42-51.
(c) Radoslaw Spiewak, reprinted with permission.”

EVALUAREA REACTIILOR LA PATCH-TEST STANDARD:

±	Reactie neconcludenta, posibil cauzata de un slab efect iritant: eritem slab fara infiltratii
+	Reactie slaba: eritem cu infiltratii si posibile papule
++	Reactie puternica: eritem, infiltratii, papule si vezicule
+++	Reactie extrem de puternica: eritem, infiltratii, papule, vezicule confluyente sau bule
-	Reactii negative
IR	Reactii iritante
NT	Netestat

Se face media aritmetica a celor 3 aplicari similare ale aceluiasi produs, pe acelasi pacient, apoi se evalueaza raspunsul pentru fiecare produs in parte la nivel de lot.

5. REZULTATE :

Se cuantifica reactiile iritative aparute prin calcul procentual din numarul total de subiecti participanti la test. Rezultatele sunt prezentate in tabel:

Produs testat	Eritem	Descuamare	Edem	% subiecti	Observatii
Crema de maini regeneratoare CMR	-	-	-	90%	Restul de 10% din totalul subiectilor au avut scor \pm inrosire usoara, respectiv edem, simptome care au disparut la 1 ora de la indepartarea patch-ului in ambele cazuri.
Crema pentru ten normal – protectie antioxidanta - CPAO	-	-	-	100%	-
Baza de crema – crema de maini	-	-	-	95%	Restul de 5% din totalul subiectilor au avut scor \pm inrosire usoara, respectiv edem, simptome care au disparut la 1 ora de la indepartarea patch-ului in ambele cazuri.
Baza de crema – crema ten normal	-	-	-	100%	-
LSS 0.5%	\pm	0	-	80%	20% din subiectii testati au prezentat fie edem, fie inrosire difuza, scor \pm , simptome ce dispar dupa 1 ora de la indepartarea pansamentelor ocluzive
LSS 1%	+	0	-	80%	20% din subiectii testati au prezentat fie edem, fie inrosire difuza, scor +, simptome ce dispar in primele 2 ore de la indepartarea pansamentelor ocluzive
LSS 2%	++	0	+	90%	Produsul irita in mod evident suprafata pe care a fost aplicat, scor ++, eritemul fiind persistent timp de 24h., chiar daca edemul dispare in primele 2 ore de la indepartarea pansamentelor ocluzive
Martor netratat	0	0	-	100%	-

Avand in vedere procentul mic de reactii iritative de mica intensitate comparativ cu martorii pozitivi (lauril sulfat de sodiu - LSS- in concentratii progresive), produsele testate pot fi aplicate in siguranta pe piele, prezentand o buna toleranta, fara a se inregistra efecte adverse, imediate sau intarziate.

B. EVIDENȚIEREA EFICACITĂȚII PRODUSELOR PENTRU PROTECȚIE ȘI REGENERARE CUTANATĂ

1. OBIECTIV/SCOP

Scopul acestui test este acela de a evalua capacitatea produselor de a restabili hidratarea și de a reface textura pielii. **Produsele testate sunt:**

- **Crema de protecție antioxidantă (CPAO)**, destinată tenului normal ca prevenție a agresiunii factorilor de mediu nocivi: fluctuații de temperatură, radiații UV, etc. Are în compoziție extractele TES și galbenele (Gb) în proporție 9:1.
- **Crema de mâini regeneratoare (CMR)**, destinată îngrijirii mâinilor și refacerii în urma agresiunii chimice (detergenți, etc), a deshidratării, etc. Are în compoziție extractele TES, galbenele (Gb) și castan (Cs), în proporție 9:1:9.

2. METODOLOGIA

Se vor utiliza metode instrumentale ce determină: **nivelul de hidratare al pielii** prin aplicarea metodei capacitantei în mediu dielectric (Corneometru CM 825); **parametrii de suprafață ai pielii**: rugozitatea (media dintre adâncimea și lățimea liniilor) și descuamarea (indica gradul de exfoliere a stratului cornos) prin ilustrarea grafică a suprafeței pielii în condiții de iluminare specială și procesare electronică a imaginii (VisioScan VC98).

Voluntarii clinic sănătoși se vor selecta prin metoda randomizării din baza de date generală, conform criteriilor de includere/excludere. Crema se va aplica pe o suprafață bine delimitată a zonei dorsale a antebrațului. Ca agent de perturbare a echilibrului hidro-lipidic se va utiliza **dodecil sulfat de sodiu (SDS)** 10%, un detergent anionic ce acționează asupra lipidelor intracelulare. Doza aplicată se situează sub cele menționate în Fișa de siguranță a produsului ca fiind slab iritantă pentru pielea umană.

Toate determinările se realizează comparativ cu martorul contralateral netratat.

3. TIPUL TESTULUI: - metoda de analiză cutanată instrumentală, neinvazivă. Tipul investigației este “single blind” (investigatorul cunoaște produsul de testat, subiecții însă nu); Studiul este unul de tip comparativ, urmărind definirea eficacității produsului prin comparație pre și post tratament cât și față de martorul contralateral netratat.

Etapele testului vor fi următoarele:

- Măsurarea parametrilor inițiali

- Aplicare SDS 10% prin badijonarea unei zone strict delimitate, dupa care se lasa sa actioneze timp de 30 de minute.
- Masurarea parametrilor dupa actiunea SDS
- Indepartarea SDS prin clatire cu apa; zona se sterge prin tamponare
- Aplicarea produselor de testat
- Masurarea parametrilor dupa 6 ore de actiune.
- Masuratorile se vor compara cu martorul contralateral.

4. ALEGEREA VOLUNTARILOR

Testarile se realizeaza in acord cu principiile etice formulate in Declaratia de la Helsinki referitoare la testarile pe subiecti umani, incluzand pastrarea confidentialitatii asupra tuturor inregistrarilor si documentelor. Drepturile, siguranta si confortul subiectilor umani participanti la testari sunt mai presus de orice alte interese stiintifice sau sociale. Inainte de participarea la astfel de studii, fiecare subiect si-a dat consimtamantul liber exprimat, cunoscand detaliile tuturor etapelor de derulare a testarilor. **Criteriu de includere:** voluntari ce au fost informati de particularitatile testului si au semnat consimtamantul, clinic sanatosi, rasa caucasiana. **Criteriu de excludere:** maladii dermatologice care pot interfera cu evaluarea, sarcina, participarea la alte studii simultane sau la un interval scurt de timp, tatuaje, arsuri solare, cicatrici in regiunile testate. In cazul in care exista retrageri sau excluderi din lotul de testare, subiectii vor fi inlocuiti prin randomizare din Lista generala a voluntarilor.

5. CRITERII DE EFICACITATE

Produsele trebuie sa minimizeze efectele induse de SDS si sa se restabileasca echilibrul hidro-lipidic si textura pielii.

6. CRITERII DE SIGURANTA

La manifestarea oricaror reactii adverse severe se va intrerupe testarea si se va administra tratament specific.

7. SCALA DE EVALUARE

Se va evalua procentual variatia parametrilor de interes (hidratare, descumare, rugozitate), comparand valorile finale fata de cele initiale. Se vor compara valorile inainte de tratament cu cele masurate dupa actiunea SDS (30 de minute de actiune), respectiv dupa aplicarea produsului testat (6h de actiune). Variatia procentuala fata de initial, respectiv tratamentul cu SDS se calculeaza dupa urmatoarele formule:

% variatie fata de parametrul initial =100 - (Valoarea finala dupa crema* 100 / Valoarea initiala)

% variatie fata de parametrul de interes dupa tratarea cu SDS =100 - (Valoarea finala dupa crema* 100 / Valoarea dupa SDS)

REZULTATE :

Rezultatele vor fi prezentate in cele ce urmeaza sub forma mediilor aritmetice ale parametrilor de interes (hidratare, rugozitate si descumare), pe lotul de voluntari inclusi in testare. Interpretarea va avea in vedere semnificatia parametrilor, asa cum a fost descrisa in capitolul anterior si variatiile procentuale in cele doua etape de evaluare: dupa tratamentul cu SDS si la finalul testului.

DEMONSTRAREA EFECTULUI DECLARAT al CREMEI DE MAINI CU EFECT REPARATOR – CMR

a) HIDRATARE – masuratori de corneometrie

Nr. crt.	Valori ale masuratorilor de hidratare CREMA DE MAINI CU EFECT REPARATOR - CMR		
	Initial	Dupa SDS- (30'actiune)	Dupa produs (6h actiune)
1.	22,86	20,96	27,92
2.	38,3	27,48	41,96
3.	22,56	17,36	34,92
4.	21,06	16,32	31,42
5.	27,88	21,06	38,54
Media	26,532	20,972	34,952
Hidratare (%)	100	77,77	131,72
% variatie fata de initial, respectiv SDS		-22,22	+53,95

Tabel. Nr. . Efectul de hidratare cutanata in cele trei etape: initial (inainte de aplicarea de produse), dupa actiunea SDS (30 de minute de actiune) si dupa actiunea produsului (6 ore de actiune).

b)PARAMETRII SELS (Surface Evaluation of Living Skin)_Descuamare:

DESCUAMARE - S_{Esc} - CREMA DE MAINI CU EFECT REPARATOR - CMR			
Subiect	initial	dupa SDS	dupa crema
1	0,44	1,33	0,33
2	0,47	0,7	0,51
3	0,69	1,45	0,9
4	0,76	1,25	0,41
5	1,24	1,77	0,71
Media aritmetica a masuratorilor	0,72	1,3	0,572
% variatie fata de initial, respectiv SDS		+20,55	- 56

Tabel nr. Descuamarea (S_{Esc}) in cele trei etape: initial (inainte de aplicarea de produse), dupa actiunea SDS (30 de minute de actiune) si dupa actiunea produsului (6 ore de actiune)

c)PARAMETRII SELS (Surface Evaluation of Living Skin)_ Rugozitate:

RUGOZITATE - S_{ER} - CREMA DE MAINI CU EFECT REPARATOR - CMR			
Subiect	initial	dupa SDS	dupa crema
1	1,45	1,72	1,72
2	1,15	1,95	1,59
3	1,87	2,84	1,6
4	3,12	2,01	1,72
5	2,42	3,55	1,46
Media aritmetica a masuratorilor	2,002	2,414	1,618
% variatie fata de initial, respectiv SDS		+19,18	-32,97

Tabel 12. Rugozitatea (S_{ER}) pielii in cele trei etape de testare si anume: initial (inainte de aplicarea de produse), dupa actiunea SDS (30 de minute de actiune) si dupa actiunea produsului (6 ore de actiune)

Produsul Crema de maini – CMR -hidrateaza stratul corneum cu aproximativ 30% fata de valorile initiale. Descuamarea si rugozitatea sunt de asemenea reduse reduse de produsul testat.

DEMONSTRAREA CAPACITATII DE REGENERARE CUTANATA a CREMEI DE PROTECTIE ANTIOXIDANTA (CPAO)

a)HIDRATARE - masuratori de corneometrie

Nr. crt.	Valori ale masuratorilor de hidratare CREMA DE PROTECTIE ANTIOXIDANTA (CPAO)		
	Initial	Dupa SDS (30'actiune)	Dupa produs (6h actiune)
1.	26,94	17,08	28,15
2.	27,76	22,34	33,56
3.	31,04	23,24	30,72
4.	33,3	27,06	33,48
5.	31,44	30	30,88
Media	30,096	23,944	33,024
Hidratare (%)	100	76.07	104.19
% variatie fata de initial, respectiv SDS		-20,44	+24,64

Tabel. Nr. . Efectul de hidratare cutanata in cele trei etape: initial (inainte de aplicarea de produse), dupa actiunea SDS (30 de minute de actiune) si dupa actiunea produsului (6 ore de actiune).

b) PARAMETRII SELS (Surface Evaluation of Living Skin)_Descuamare:

DESCUAMARE - S _{Esc} - CREMA DE PROTECTIE ANTIOXIDANTA (CPAO)			
Subiect	initial	dupa SDS	dupa crema
1	0,39	0,75	0,49
2	1,71	1,59	0,69
3	0,52	1,22	0,43
4	0,55	1,76	0,27
5	0,36	0,36	0,25
Media aritmetica a masuratorilor	0,706	1,136	0,426
% variatie fata de initial, respectiv tratamentul cu SDS		+39,66	-62,5

Tabel nr. Descuamarea (S_{Esc}) in cele trei etape: initial (inainte de aplicarea de produse), dupa actiunea SDS (30 de minute de actiune) si dupa actiunea produsului (6 ore de actiune)

c) **PARAMETRII SELS (Surface Evaluation of Living Skin)_Rugozitate:**

RUGOZITATE - SER - CREMA DE PROTECTIE ANTIOXIDANTA (CPAO)			
Subiect	initial	dupa SDS	dupa crema
1	1,88	3,01	1,41
2	2,18	2,56	1,53
3	1,27	1,66	0,57
4	1,52	2,95	1,84
5	1,68	1,84	1,2
Media aritmetica a masuratorilor	1,706	2,404	1,31
% variatie fata de initial, respectiv tratamentul cu SDS		+23,21	-45,50

Tabel 12. Rugozitatea (SEr) pielii in cele trei etape de testare si anume: initial (inainte de aplicarea de produse), dupa actiunea SDS (30 de minute de actiune) si dupa actiunea produsului (6 ore de actiune)

Produsul Crema pentru ten normal – protectie antioxidanta – CPAO- restabileste hidratarea stratului corneum in conditiile actiunii unui detergent ca agent deshidratant extern. De asemenea, descumarea si rugozitatea sunt reduse semnificativ de catre produsul testat, demonstrand efectul de regenerare si refacere a epidermei indus de **Crema pentru ten normal – protectie antioxidanta.**