

**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

CSIII. Dr. Laura Olariu - Membru Asociat AOSR



REZUMATUL PROIECTULUI

Proiectul științific **„Dezvoltare la nivel de laborator a unui produs regenerativ dermo-epidermic, prin valorificarea unei asocieri inovative între complexe active din deseuri și extracte vegetale”** este o continuare a proiectului: **„Valorificarea reziduurilor din vinificație ca aditivi alimentari și antioxidanți în industrie”**, cu scopul de a concretiza cercetările efectuate în studii aplicative și tehnologice. Se vizează dezvoltarea la nivel de laborator a unui produs / produse originale de uz topic, cu adresabilitate în regenerarea pielii. Activitățile ce converg la realizarea acestui obiectiv se referă la selecția componentelor vegetale în concordanță cu sinergismul și complementaritatea acțiunii biologice față de extractul din reziduuri de vinificație, caracterizarea analitică a compusilor activi, condiționarea unor variante de gel/ crema/ unguent și alegerea tipului de formulare optim, evaluarea compatibilității cu pielea umană și a efectului de produs. Realizarea acestui proiect deschide perspectiva concretă a transferului de cunoștințe și tehnologie către un nivel superior de maturitate și de exploatare, cu valorificarea deșeurilor de plantă și în mod special a celor rezultate din procesul de vinificație în produs de uz topic eficient în perturbări ale statusului pielii cu largă incidență (îmbătrânire, vindecare răni, etc). Proiectul are, de asemenea, în vedere diseminarea rezultatelor la nivel național și internațional prin comunicări și publicații științifice.

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

CUPRINS

INTRODUCERE

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

CAPITOLUL II: FORMULARI INOVATIVE PENTRU PREPARATE DE UZ TOPIC CU EFECT ANTIOXIDANT SI REGENERATOR

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

CONCLUZII

INTRODUCERE

Sinergismul si complementaritatea actiunilor la nivel celular si molecular demonstrate pentru extractul din reziduuri de vinificatie (TES) si extractul de galbenele (Gb) si castan (Cs) genereaza o complexitate structurala cu efect antioxidant si regenerador cutanat ce isi poate transpune aplicabilitatea in terapii dermatologice si dermatocosmetice cu mare impact. Etapele anterioare de cercetare au definit compozitia in principii active (flavonoide, polifenoli), si relatia structura / activitate biologica demonstrata prin studiile „in vitro” pe keratinocite si fibroblasti. Cele trei conditii de stimulare pro-inflamatorie si pro-oxidativa aplicate in modelele experimentale si activitatea biologica demonstrata au selectionat urmatoarele combinatii de principii active cu potential antioxidant si regenerador cutanat optim: **C1_TES:Gb (9:1)** – stimuleaza protectia antioxidanta intrinseca si extrinseca prin activarea glutationului intracelular si reducerea radicalilor liberi oxigenati; si **B2_TES:Cs (1:1)** – activeaza intracelular enzimele de aparare antioxidanta, catalaza si superoxid-dismutaza, si ca o consecinta, reduc ambele tipuri de radicali liberi oxigenati.

In aceasta etapa studiile vor continua in sensul evidentierii potentialului de regenerare dermo-epidermica al asocierilor de extracte. Astfel, se vor realiza teste privind homeostazia matricei extracelulare din perspectiva proceselor de biosinteza proteica si degradare enzimatica. Rezultatele se vor integra si transfera in formulari topice prin dezvoltarea la nivel de laborator a unor produse originale, cu adresabilitate in regenerarea pielii. Se va urmari astfel finalizarea ciclului de valorificare a deseurilor de planta si in mod special a celor rezultate din procesul de vinificatie prin conditionarea unor variante de gel/ crema/ unguent si evaluarea compatibilitatii cu pielea umana si a efectului de produs.

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 fibroblasti, keratinocite, celule endoteliale, leucocite polimorfonucleare și monocite. Expresia crescută a MMP-2 poate fi detectată în țesutul conjunctiv, fibroblasti 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 liză, iar identificarea tipului de MMP se realizează pe baza masei moleculare – vezi **figura 1**.

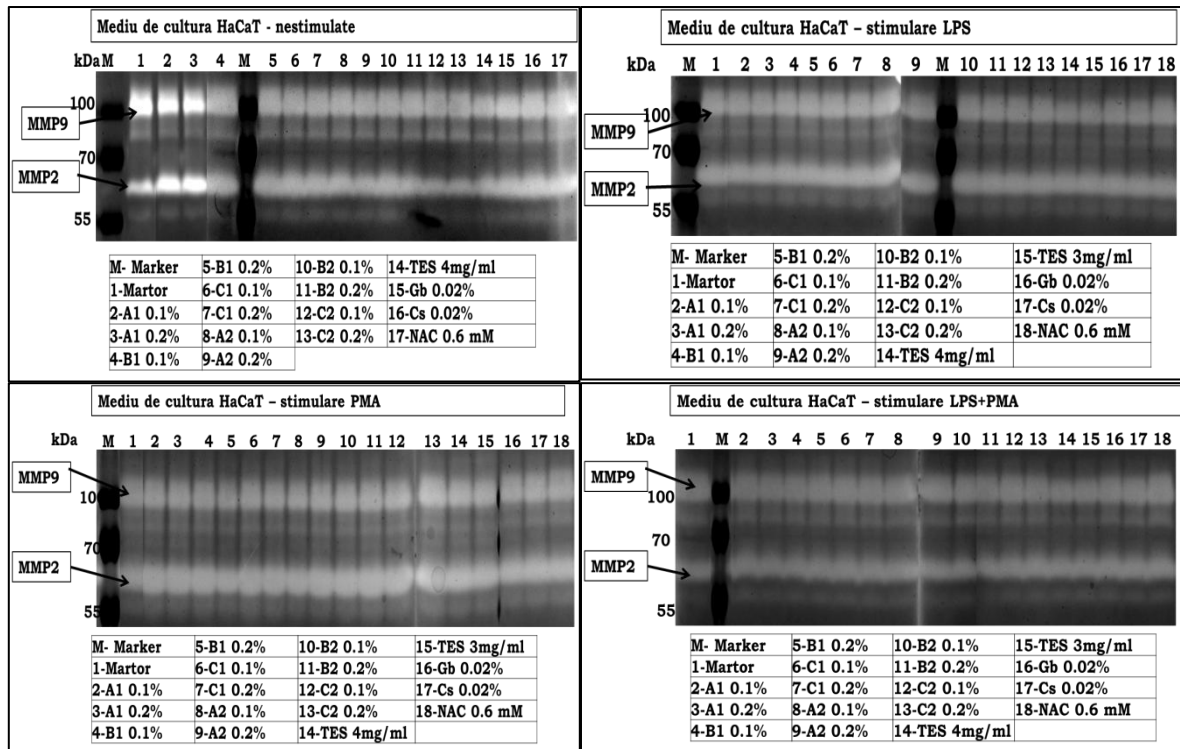


Figura 1. Expresia MMP2 si 9 evaluata prin gelatin-zimografie in prezenta biocomplexelor vegetale

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**.

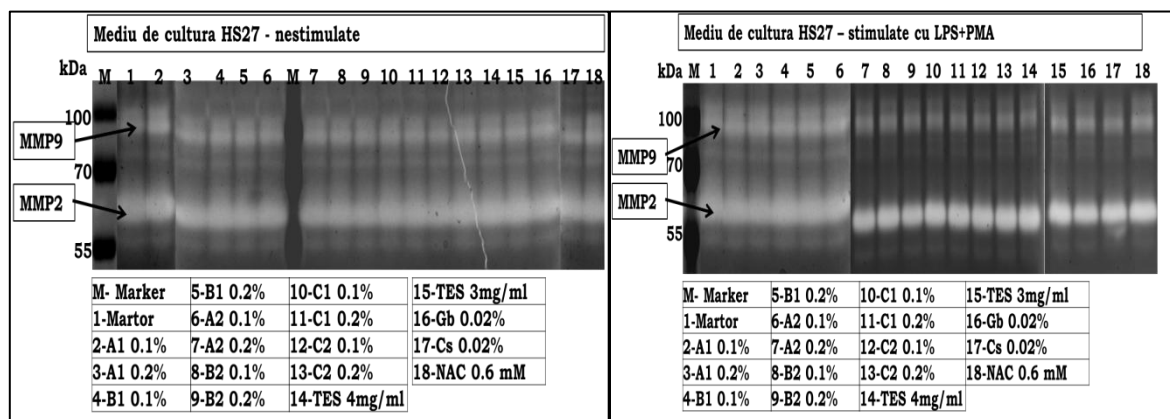


Figura 2. Expresia MMP 2 si 9 evaluata prin gelatin-zimografie in prezenta biocomplexelor vegetale

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 enzimatice 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 enzimatice 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 enzimatice a metaloproteinazelor matriceale.

b. Evaluarea *in vitro* a efectului de refacere tisulara 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

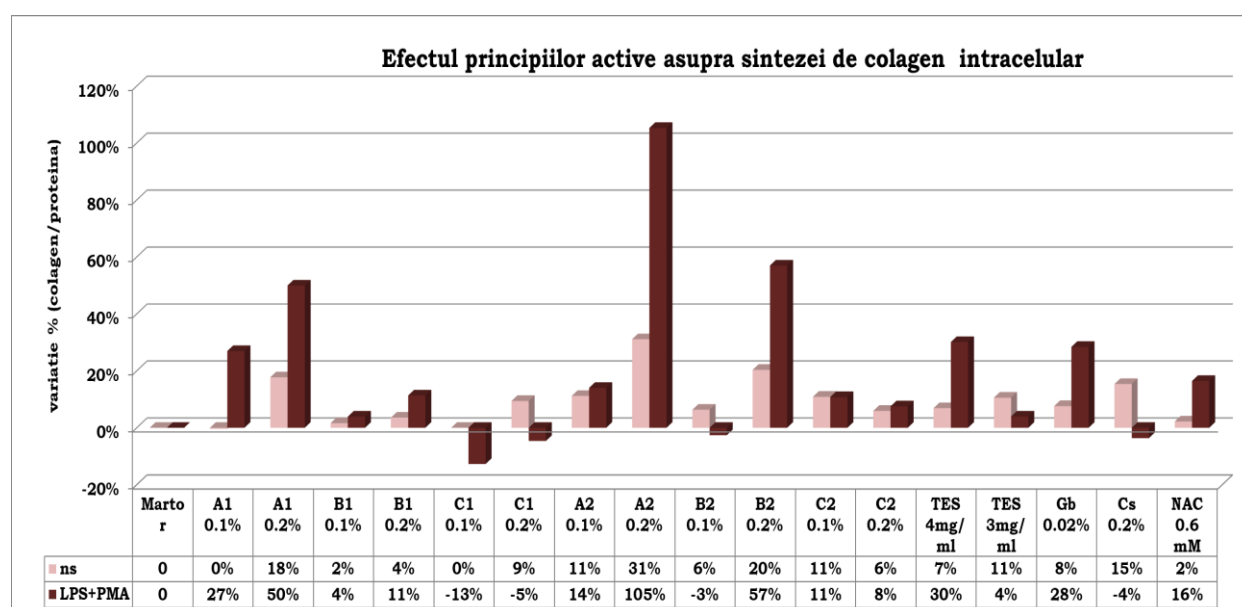


Figura 3. Evaluarea nivelului de colagen biosintetizat de fibroblasti.

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 glutathionului 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 II: FORMULARI INOVATIVE PENTRU PREPARATE DE UZ TOPIC CU EFECT ANTIOXIDANT SI REGENERATOR

Stratul corneum al pielii acționează ca o barieră care izolează organismul de mediul înconjurător și împiedică pierderea apei din țesuturi. Acesta este esențial pentru procesele fiziologice ale pielii și ale întregului organism, dar face dificilă absorbția topică a substanțelor în țesuturi. Rezolvarea acestui impediment a fost abordată inițial empiric, prin utilizarea de materiale grase sau uleioase în produsele de îngrijire a pielii. Realizările tehnologice în administrarea topică a medicamentelor și în produsele de îngrijire a pielii au condus la dezvoltarea de vehicule și de adjuvanți ai penetrării, precum și la designul formulărilor avansate din punct de vedere tehnologic. Deși structurile chimice sintetice au fost folosite intens în acest domeniu, practicile și studiile științifice au demonstrat că sursele botanice pot oferi medicamentelor și compușilor activi vehicule pentru îmbunătățirea permeabilității lor prin piele. Compușii naturali asigură, în cele mai multe cazuri, caracteristici dezirabile, cum ar fi biocompatibilitatea, iritarea scăzută și repartizarea optimă a permeanților în piele. Mai mult, ele sunt caracterizate de o mare diversitate chimică pentru dezvoltarea de noi componente care să fie utilizate în formulările dermatologice și cosmetice. O tendință în creștere a industriilor cosmetice și farmaceutice este înlocuirea produselor sintetice și revenirea la utilizarea ingredientelor naturale. În consecință, există un interes în creștere în utilizarea principiilor active naturale din diferite surse de plantă, bine caracterizate. Comercializarea acestor produse pe scară largă poate oferi beneficii majore atât comunităților locale din țările dezvoltate, cât și din cele subdezvoltate, în ceea ce privește reîmpădurirea terenurilor marginale, noua activitate agricolă diversificată, dezvoltarea durabilă a condițiilor rurale și utilizarea resurselor naturale regenerabile.

Până la începutul anilor 1900, nu a existat nicio diferență clară între componentele active și cele inactive în preparatele dermatologice și cosmetice. Ulterior, a devenit posibil să se atribuie efecte terapeutice specifice anumitor substanțe chimice și a început să se dezvolte conceptul de vehicul - substanță purtătoare relativ inertă. În zilele noastre, formulările sunt amestecuri de componente care includ, practic, unul sau mai multe vehicule și unul sau mai multe principii active. Eficacitatea produselor dermatologice și cosmetice este influențată de tipul vehiculului și de principiile active. Eficacitatea formulării este determinată de pătrunderea ingredientelor active în epidermă sau derma, în funcție de efectul terapeutic scontat. Prin urmare, selecția corectă a unui vehicul adecvat joacă un rol important în dezvoltarea unui produs.

Preparatele farmaceutice au ca scop obținerea unui efect curativ. În aceste cazuri, rolul vehiculului este în primul rând acela de a permite livrarea principiilor active pe locul de aplicare. Formulările cosmetice nu conțin medicamente strict curative, dar scopul lor este mai degrabă acela de a ajuta homeostazia pielii și de a preveni procesele degenerative. Așa cum am văzut, nu se poate urmări cu ușurință o graniță clară între domeniul medical și cel cosmetic, în timp ce tendința marcantă a industriilor cosmetice de a dezvolta produse care conțin principii active farmaceutice a dus la introducerea conceptului de produse dermatocosmetice sau cosmeceutice. Acest termen indică produsele cosmetice hibrid farmaceutic care vizează îmbunătățirea frumuseții pielii cu ajutorul unor ingrediente care modifică funcționalitatea țesutului cutanat sau oferă funcții sau beneficii suplimentare legate de sănătate. În produsele cosmetice și cosmeceutice, vehiculul are o importanță deosebită, deoarece, în general joacă, de asemenea, funcții specifice de îngrijire a pielii. Vehiculele pot fi folosite ca produse de curățare, cum ar fi în săpunuri și detergenți; ca agenți de hidratare a pielii, ca diverse uleiuri și substanțe grase asemănătoare sebumului; și pentru protecția pielii împotriva agenților nocivi pentru mediu, cum ar fi ecrane anti-UV. În pofida creșterii eforturilor tehnologice în domeniul îngrijirii pielii, cu noi clase de vehicule complexe fiind cercetate continuu, până în prezent nu a fost identificat niciun vehicul universal. Fiecare principiu medicamentos sau pe bază de plante necesită un vehicul diferit pentru un tratament optimizat. În plus, *stabilitatea și compatibilitatea excipienților și a părții active sunt elemente esențiale pentru formulările farmaceutice sau cosmetice, însoțite de siguranța locală și sistemică a componentelor acestora*. Practic, vehiculul trebuie să aibă capacitatea de a pătrunde în stratul cornos al epidermei, și, prin urmare, să furnizeze, la viteze adecvate, principiile active la nivelul locului epidermic, dermic sau subdermic, în cazul în care este necesară acțiunea acestor principii. Stratul cornos este format din corneocite îterretelate cu o matrice lipidică specializată care formează bariera protectoare a umidității pielii. Corneocitele derivă din diferențierea terminală a keratinocitelor, care migrează din straturile epidermice interioare. Capacitatea stratului cornos pentru reținerea apei se datorează mai multor compuși cu greutate moleculară mică, incluzând ioni minerali, acid lactic, uree, aminoacizi și acid urocanic, care derivă predominant din descompunerea proteinei filaggrin-asociate cheratinei. Acești compuși sunt cunoscuți sub denumirea de **factor natural de hidratare (NMF)**, care funcționează ca umectant și atinge cele mai înalte niveluri în cele mai profunde regiuni ale stratului cornos, unde se păstrează cea mai mare cantitate de apă. Matricea lipidică a stratului cornos constă în principal din acizi grași, ceramide și colesterol. Acești compuși hidrofobi formează straturi care înconjoară faza hidrofilă de mai sus, având ca rezultat încetinirea

pierderii transepidermice a apei (TEWL) . Modificările componenteii lipidice conduc la creșterea TEWL, rezultând un aspect uscat și îmbătrânit al pielii. O consecință bine cunoscută a prezenței fiziologice a unei bariere lipidice în pielea exterioară este că unii compuși solubili în apă, cum ar fi electroliții polari și sărurile ionizate, pătrund slab în piele, în timp ce moleculele lipofile pătrund mai ușor. Măsurarea absorbției percutanate a substanțelor chimice exogene prezintă un interes semnificativ în ceea ce privește furnizarea de molecule de interes farmaceutic și cosmetic. Evaluarea permeabilității pielii la anumite substanțe active prin utilizarea de experimente in vivo este extrem de dificilă. Prin urmare, au fost stabilite și validate metodele in vitro care utilizează pielea în celule de difuzie. Exciziile pielii umane și pielea animalelor au fost utilizate pentru evaluarea *ex-vivo* a penetrării percutanate, în timp ce tendințele actuale se îndreaptă spre introducerea de modele de epidermă umană reconstituite.

Vehiculele. Vehiculele pot fi clasificate după diferite principii descrise în literatura de specialitate. Cu toate acestea, preparatele cosmetice sunt sisteme destul de complexe și, prin urmare, este foarte dificil de instituit un sistem universal de clasificare. În funcție de vehiculul utilizat, aspectul preparatelor dermatologice și cosmetice poate fi lichid, semisolid sau solid, deși în funcție de temperatură, un vehicul pe bază de lipide poate fi lichid sau semisolid. Materialele apoase, uleiul sau grăsimea, pulberea și materialele emulsionate pot fi combinate pentru a forma o varietate de formulări topice. Într-un sistem monofazic, numai substanțele cu solubilitate reciprocă sunt combinate împreună, în timp ce în sistemele multifazice, precum emulsiile și suspensiile, componentele de formare sunt insolubile reciproc. Mai mult decât atât, prepararea și solubilizarea sistemelor multifazice necesită adăugarea de substanțe amfifile, cum ar fi emulgatorii și surfactanții. O prevalență de componente apoase se găsește în săpunuri și loțiuni. Suspensiile sunt sisteme simple de dispersie constând din particule, care conțin în general principii active, dispersate într-o fază lichidă. Cremele includ porțiuni mai mult sau mai puțin echivalente de componente apoase, emulsionante și lipide (de exemplu, creme ulei în apă sau apă în ulei). Unguentele constau dintr-un amestec de ulei și emulsionant, uneori cu o prezență mai mică a apei (unguente apă-în-ulei) sau prezența exclusivă a substanțelor grase. Pastele sunt amestecuri de pulberi și uleiuri. De asemenea, pulberile sunt utilizate singular. Emulsiile sunt probabil cele mai frecvente formulări, datorită percepției de confort a consumatorilor și ușurinței de aplicare. Emulsiile sunt produse bifazice care conțin atât compuși lipofili cât și hidrofilii, care sunt menținuți într-o stare mixtă metastabilă de către un emulgator. Acestea pot fi fie de tipul apă-în-ulei (w/o), fie ulei-în-apă (o / w). Sistemele bifazice pot fi considerate în analogie cu celulele pielii, deoarece în ambele cazuri sunt prezente componente lipofile și hidrofile. Un alt sistem de administrare, mai asemănător cu

aranjamentul structural al unei celule vii este reprezentat de lipozomi. Lipozomii sunt vezicule sferice constând dintr-o fază lichidă înconjurată de o membrană. Aceasta din urmă este formată din una sau mai multe straturi de fosfatidilcolină sau alte fosfolipide, care sunt principalele componente ale membranelor celulare. Fosfatidilcolina este obținută în principal din soia și prezintă o compoziție de acizi grași dominată de acizi grași nesaturați. Fosfatidilcolina din soia poate conține până la 70% acid linoleic și este capabilă să fluidizeze componenta lipidică a stratului excitat și să furnizeze acid linoleic foarte eficient în piele. Acest mecanism sta la baza proprietăților antiacneice ale extractelor de soia. Alte formulări tip dispersie avansate din punct de vedere tehnologic, constau în aplicații ale nanoparticulelor, particule cu dimensiuni cuprinse între 10 și câteva sute de nanometri, care sunt utilizate ca purtători pentru substanțe active. Nanoparticulele sunt formate de obicei, din micellele lipidice lichide sau solide acoperite de un agent tensioactiv și dispersate într-un mediu apos. Pe lângă utilizarea pe scară largă a compușilor pe bază de plante ca principii active, unele dintre acestea pot constitui vehicule în formulări topice. Surse botanice furnizează aproape orice fel de vehicule posibile, inclusiv emulgatori, tensioactivi, uleiuri și unturi, ceară și soluții hidrofile. Aceste substanțe combină proprietățile de eliberare de medicamente pe piele, tipice vehiculelor, cu capacitatea de a produce acțiuni specifice pe piele, cum ar fi efecte ocluzive, hidratante, netezitoare, ferme, calmante și de condiționare. Hidratarea pielii este esențială pentru sănătatea pielii. Formulările hidratante includ, în general, compuși ocluzivi și umectanți. Se crede că ocluzivele, cum ar fi diferite uleiuri vegetale, se hidratează formând un scut hidrofob pe suprafața externă a stratului cornos, sub care apa este prinsă. Umectanții, precum glicerina și urea, atrag apa din mediul înconjurător în stratul cornos.

Acizii α -Hidroxi (AHA) sunt acizi organici care îmbunătățesc hidratarea pielii, reduc ridurile și stimulează reînnoirea celulelor. Cei mai frecvent utilizați în produse cosmetice sunt acizii glicolici, malici, lactici și citrici. Mucilagiile, cum ar fi cele ale gelului de aloe, sunt substanțe bogate în mucopolizaharide, care au capacitatea de a forma un înveliș protector peste piele și, prin urmare, au proprietăți hidratante. Glicozaminoglicanii precum acidul hialuronic și condroitin sulfatul sunt compuși puternic hidroxilați capabili să rețină cantități mari de apă. Acidul hialuronic este un polizaharid liniar, format din unități de dizaharide care conține N-acetil-D-glucosamină și acid glucuronic, care este utilizat pe scară largă în produse cosmetice pentru diferite scopuri, inclusiv hidratarea. Moleculele cu acid hialuronic cu greutate moleculară mare formează un film superficial, în timp ce moleculele cu greutate moleculară mică pot pătrunde în piele împreună cu apa de legătură și hidratează straturile mai adânci decât stratul cornos. Uleiurile derivate din plante sunt bogate în acizi grași esențiali

(EFA), despre care se știe că reglează TEWL și sunt cofactori de hidratare valoroși în produse cosmetice. Unul dintre cele mai populare materiale lipidice în formulările cosmetice este ceara lichidă de jojoba (*Simmondsia chinensis*), un amestec de acizi grași și esteri grași de alcool, care este folosit pur sau în emulsii ulei în apă pentru loțiuni și creme hidratante. Prezența lipidelor naturale în produsele cosmetice le face deosebit de potrivite pentru pielea xerotică. În plus, EFA-urile exercită o acțiune calmantă care protejează pielea împotriva factorilor de stres din mediu, cum ar fi soarele, vântul și poluanții atmosferici. Această acțiune, posibilă asociată cu antioxidanți naturali, cum ar fi tocoferolii, este eficientă și în încetinirea proceselor care provoacă îmbătrânirea prematură a pielii, cum ar fi TEWL excesiv și specii reactive de oxigen. Emolienții sunt substanțe adăugate produselor cosmetice pentru a înmuia și netezi pielea. Acestea funcționează prin umplerea spațiilor dintre desecumarea corneocitelor și multe dintre ele acționează, de asemenea, ca umectanți sau ocluzive. Emolienții obișnuiți sunt uleiul de jojoba menționat mai sus; ulei de ricin, obținut din bobul de ricin (*Ricinus communis*); și diferite alte uleiuri vegetale.

Surfactanții. Surfactanții sunt folosiți în tehnologia cosmetică pentru crearea unei varietăți de sisteme dispersate, cum ar fi suspensiile și emulsiile. Acestea sunt de obicei adăugate la formulări apoase pentru a solubiliza ingrediente active lipofile și astfel au potențialul de a promova absorbția lipidelor în stratul cornos. Surfactanții au cel puțin un fragment polar și unul nepolar și, prin urmare, au, de asemenea, capacitatea de a produce spumă datorită reducerii tensiunii de suprafață. Aceștia pot fi clasificați ca agenți de curățare, de emulsionare și de solubilizare sau ca spumanti. Atât compușii sintetici cât și cei naturali, ionici sau nonionici, sunt folosiți ca agenți tensioactivi în produsele farmaceutice și cosmetice. Surfactanții anionici (de exemplu, lauril sulfat de sodiu (SLS)) și cationici (de exemplu, bromură de cetiltrimetil amoniu) pot deteriora pielea. SLS este un puternic iritant și crește pierderea de apă transepidermică. Surfactanții neionici sunt considerați mai siguri decât agenții tensioactivi ionici și, în general, au o toxicitate cronică scăzută. Mai mult, bioemulsifiantele au diverse avantaje față de agenții tensioactivi chimici, precum toxicitate scăzută, biodegradabilitate și biocompatibilitate. Glicozidele alchilice și ale acizilor grași care apar în mod natural sunt, în general, surfactanți fără gust, inodori, netoxici, noniritanți și biodegradabili. Prin urmare, au aplicații largi în industria alimentară, produselor cosmetice, detergenților și consumabilelor medicale. O mare varietate de acest tip de compuși sunt produși de bacterii și ciuperci, dar sunt prezenți și la plantele superioare. Esterii de zaharoză a acizilor grași (SEFA) sunt agenți tensioactivi nonionici constând dintr-un zahăr (de exemplu, glucoză sau zaharoză) ca grupă hidrofilă și un acid gras ca grupare lipofilă. SEFA sunt

prezente, de exemplu, în exudatele de la suprafața frunzelor din plantele Solanaceae din genurile *Datura*, *Lycopersicon*, *Nicotiana* și *Solanum*. O serie de alchil glicozide simple, sau glicozide cu alcooli grași, izolate din diferite specii de plante prezintă, de asemenea, interes pentru mai multe aplicații. Alchil glicozidele au fost izolate de fructele de acerola (*Malpighia glabra*), uleiul esențial al frunzelor uscate de oregano (*Origanum vulgare*), extractul metanolic de fructe de chimen (*Cuminum cyminum*), fructul de bupleurum (*Bupleurum falcatum*) și părți aeriene ale plantei de salvie *Phlomis lunariifolia*. Alți tensioactivi naturali de mare interes sunt acidul gras (FA) amide, precum ceramide, anandamidă, oleamidă, N-arachidonoyldopamina și N-aciletanolamină. Acești compuși au în general proprietăți biologice ridicate. De exemplu, N-palmitoyletanolamina este un antiinflamator conținut în uleiul de soia și arahide. Glicozidele cu amide FA, cum ar fi gangliosidele, aminoglicozidele și derivații lor, arată, de asemenea, activități biologice. Alți agenți tensioactivi includ glicozide carotenoide, glicolipide izoprenoide și terpenoizi. Saponinele sunt glicozide ale triterpenelor, steroizilor sau alcaloizilor steroidici cu proprietăți ridicate de agent tensioactiv. Acești compuși își derivă numele din planta de săpun (*Saponaria officinalis*), ale cărei rădăcini au fost utilizate în mod tradițional ca săpun. Alte surse botanice cunoscute de saponine includ ginseng (*Panax ginseng*), rădăcinile de lemn dulce (*Glycyrrhiza glabra*) și ruscus (*Ruscus aculeatus*) și semințele de castan (*Aesculus hippocastanum*)

Agenți de îngroșare. Datorită criteriilor largi de performanță pe care trebuie să le îndeplinească produsele cosmetice, agenții de îngroșare care cresc vâscozitatea sunt frecvent utilizați în formulări topice. Aceste materiale au rol în producția de produse cosmetice solide sau de a oferi suspensii, emulsii sau unguente mai ușor de aplicat și mai atragătoare cu îmbunătățirea caracteristicilor de hidratare, emoliență și absorbție ale pielii. În funcție de tipul de formulare, agenți de îngroșare apoși sau uleioși sau amestecul acestuia trebuie folosit. Cele mai frecvente substanțe naturale de îngroșare apoase includ polizaharide, cum ar fi caragenanul; o polizaharidă sulfată extrasă din alge roșii, glucomannan, care este prezentă în gelul de aloe și este deosebit de abundentă în cormul plantei konjac (*Amorphophallus konjac*); guma xantan, un produs bacterian obținut în urma proceselor de fermentație operate de *Xanthomonas campestris*; guma de guar, un galactomannan obținut din boabele de guar (*Cyamopsis tetragonoloba*); și guma de carob, un galactomannan extras din semințele arborelui de carobă (*Ceratonia siliqua*). În plus, componentele principale ale pereților celulelor vegetale sunt, de asemenea, utilizate în mod obișnuit ca amelioratori de vâscozitate, cum ar fi pectina, a cărei sursă principală sunt citricele și celuloza, folosite în cea mai mare parte sub forma derivaților săi, cum ar fi metilceluloza și hidroxietilceluloza, care nu apar în

mod natural, dar sunt sintetizate pornind de la materialul vegetal. Proteinele sunt, de asemenea, utilizate ca agenți de îmbunătățire a vâscozității apoase, de obicei gelatină, care este obținută din colagenul conținut în produsele secundare din industria cărnii și a pielii. Exemple de agenți naturali de îngroșare uleioși includ ceara, cum ar fi ceara de carnauba, derivată din frunzele palmei de carnauba (*Copernicia prunifera*) și ceara de albine produsă de albinele de miere (*Apis mellifera*). Materialele sintetice netoxice, noniritante, lipofile derivate din substanțe naturale sunt, de asemenea, utilizate pe scară largă, inclusiv esteri ai acizilor grași de dextrină, cum ar fi palmitatul de dextrină și esterii acizilor grași cu zaharoză. Câteva polizaharide utilizate în formulările de îngrijire personală pot suferi gelarea în funcție de rezistența ionică, pH-ul și tratamentul termic. Consistența gelurilor este cauzată de formarea unei rețele tridimensionale. În prepararea stick-urilor se folosesc în mod obișnuit geluri sau amestecuri solide de ceară și grăsimi.

Amplificatori de penetrare. Deși agenții tensioactivi și emulsionanții joacă un rol în furnizarea de principii active pe piele, sunt de asemenea folosiți agenți de intensificare a penetrării, în special în formulările medicale și cosmeceutice care conțin medicamente cu difuzibilitate scăzută, cum ar fi compuși hidrofilii. Amplificatorii de penetrare acționează în general asupra stratului cornos, și posibilele lor mecanisme de acțiune includ reducerea barierei de permeabilitate a pielii prin perturbarea regiunilor lipidice bine împachetate, modificarea cheratinei intracelulare, care provoacă umflarea și hidratarea crescută și modificarea legăturilor desmosomice care asigură coeziunea dintre corneocite. În sinteză, intensificatorul de penetrare ar afecta comportamentul de împărțire lipid-proteină a compușilor vehiculați. În consecință, acestea tind să funcționeze bine cu cosolvenți, cum ar fi propilenglicol sau etanol. Amelioratorii de penetrare induc modificări în textura pielii, în special în stratul cornos, care poate duce la iritații sau alte efecte dăunătoare pentru piele și ar trebui să fie întotdeauna utilizat după o testare atentă. Cea mai simplă abordare pentru îmbunătățirea livrării transdermice și topice de produse cosmetice și medicamente este înmuierea pielii în apă. Cu toate acestea, apa exercită o activitate de îmbunătățire a penetrării foarte slabă ca agent extern, în timp ce o abordare mai eficientă constă în utilizarea de materiale ocluzive sau plasturi, care cresc cantitatea de apă din stratul cornos prin prevenirea pierderilor transepidermice de apă. Etanolul este utilizat în mod obișnuit pentru a crește solubilitatea unui medicament în vehicul și în formulările transdermice și este adesea solventul ales pentru utilizarea în plasturi. Urea este folosită și ca intensificator de penetrare, acționând probabil prin creșterea conținutului de apă al stratului cornos și exercitarea activității keratolitice. O serie de compuși organici au fost evaluați ca agenți de intensificare a

penetrației în domeniul farmacologic și cosmetic. Multe dintre acestea sunt molecule de sinteză, cum ar fi azona (1-dodecilazacicloheptan-2-one sau laurocapram), dimetilsulfoxidul (DMSO) și derivații săi, și pirolidonele și compușii înrudiți. Cu toate acestea, mulți compuși naturali găsesc, de asemenea, o aplicație largă ca potențiatori de penetrare. Absorbția medicamentelor a fost crescută printr-o mare varietate de acizi grași cu lanț lung, cum ar fi acizii oleici și laurici. S-a demonstrat, de asemenea, că efectele de îmbunătățire a permeabilității acizilor grași sunt maxime dacă sunt utilizate în combinație cu propilenglicol (PG). Acest sistem acționează probabil prin dezorganizarea straturilor multilaminare, alternative hidrofile și lipofile ale stratului cornos. Cu toate acestea, PG a fost folosit și ca potențator de penetrare la propriu. Deși mecanismul prin care acizii grași sporesc permeabilitatea medicamentelor prin piele nu este înțeles clar, acidul oleic trebuie să interacționeze cu lipidele corneene stratice și să perturbe structurile acestora, crescând astfel fluiditatea acestora și, prin urmare, fluxul de permeanți. Acizii grași au fost utilizați pentru a îmbunătăți administrarea transdermică de medicamente precum estradiolul, progesteronul, aciclovirul, 5-fluorouracilul și acidul salicilic, ceea ce indică faptul că acești intensificatori pot fi folosiți pentru a promova administrarea de permeanți lipofili și hidrofilii. Alcoolii grași pot avea, de asemenea, activitate de îmbunătățire a penetrării. Fosfolipidele sunt utilizate în mod frecvent în lipozomi pentru a transporta medicamente în și prin pielea umană, dar pot acționa, de asemenea, într-o formă nonvesiculară ca potențiatori de penetrare. Uleiurile esențiale de eucalipt (*Eucalyptus globulus*), tamaita (*Chenopodium ambrosioides*) și ylang ylang (*Cananga odorata*) au fost testate ca intensificatori de penetrare in vivo. Un astfel de fel de activitate în uleiurile volatile se datorează în principal prezenței diferiților terpeni și terpenoizi. Activitatea de îmbunătățire a terpenoidelor unice, precum eterul 1,8-cineol (eucaliptol) a fost evaluată. Acești compuși funcționează modificând natura solventului stratului cornos, îmbunătățind repartizarea medicamentului în țesut. Cu toate acestea, multe terpene au, de asemenea, activitate farmacologică, iar utilizarea lor ca stimulator trebuie, prin urmare, să fie evaluată cu atenție.

Conservanții. Pentru formularea preparatelor cosmetice sunt disponibile diverse metode de conservare, pentru a preveni alterarea și degradarea produselor lor. Datorită proprietăților de toxicitate ale multor conservanți, aplicarea și selecția lor sunt strict definite de normele legale în multe țări. Printre metodele de conservare, materialele botanice și moleculele naturale oferă posibilități diferite de utilizare. Chiar dacă aceste materiale pot presupune costuri mai mari, ele sunt deseori preferate cu scopul de a spori proprietățile dermatocosmetice ale produselor. Organismele botanice diferă de animale, prin faptul că au

dezvoltat un sistem de apărare împotriva organismelor deteriorate și a agenților patogeni, bazate pe producerea de metaboliți toxici secundari, în loc de un sistem imunitar bazat pe recunoașterea de la celule la celule și producția de anticorpi. Conservanții naturali ai plantelor, cunoscuți și ca fitoalexine, au frecvent alte efecte biologice în afară de proprietățile lor antimicrobiene. Acesta este, de exemplu, cazul resveratrolului, pentru care au fost descrise un număr mare de proprietăți terapeutice, incluzând protecția cardiovasculară și chimioprevenția tumorală, precum și unele flavonoide care prezintă proprietăți antimicrobiene și antiinflamatorii. Un număr mare de fitocomponente prezintă efecte antimicrobiene care pot fi exploatate în scopuri de conservare, inclusiv terpenoizi, acizi organici, acizi grași oxigenați, alcooli alifatici, polioli și polifenoli. Mulți dintre acești compuși nu sunt potriviți pentru utilizarea în produse cosmetice, în timp ce alții nu sunt adecvați doar ca și conservanți, dar contribuie și la efectele benefice ale formulărilor. Uleiurile esențiale sunt bogate în compuși aromatici și parfumuri, dar utilizarea lor este problematică datorită proprietăților iritative. Monoesterii de gliceril, cum ar fi caprilatul de gliceril, folosiți în general ca ingrediente hidratante, joacă, de asemenea, un rol antibacterian eficient. Esterii alchilici ai acidului p-hidroxibenzoic (parabeni) și compușii înrudiți sunt printre cei mai des utilizați conservanți în produse cosmetice, articole de toaletă și produse farmaceutice. O serie de compuși naturali aparținând acestui grup pot fi găsiți, cum ar fi acidul benzoic și alcoolul benzilic, mai ales activi împotriva bacteriilor gram pozitive, care pot fi obținute din rășini balsamice. Alte sisteme, cum ar fi lactoperoxidază și glucoz-oxidaza, un conservant natural al mierii, se bazează pe generarea enzimatică de specii reactive de oxigen precum H₂O₂. Diferiți compuși de lichen, cum ar fi acidul usnic, sunt cunoscuți și ca agenți antimicrobieni puternici. Prevenirea proceselor oxidative din formulări se realizează prin adăugarea de compuși antioxidanți corespunzători. Vitaminele sunt adăugate în mod obișnuit în produsele cosmetice, frecvent într-o formă esterificată cu acizi grași, cum ar fi acidul palmitic, pentru a crește stabilitatea acestora. Vitamina A, acidul retinoic și β-carotenul au fost aditivi populari în cosmetică de ani buni și, în plus, acești compuși au capacitatea de a regla creșterea și diferențierea keratinocitelor și de a diminua ridurile pielii. Vitamina C are o acțiune antioxidantă bună și, în plus, funcționează ca cofactor în sinteza de colagen. Vitamina E este o rezistență puternică a radicalilor liberi, în special a radicalilor peroxilici lipidici și protejează, de asemenea, pielea de leziunile UV. Dintre antioxidanții naturali, compușii fenolici sunt în prim plan, deoarece au cerințele structurale ale epidermelor cu radicali liberi. În acest scop pot fi utilizate diferite clase fenolice, incluzând acizi fenolici, antocianine, catene, derivați ai acidului hidroxicinnamic și flavonoizi.

Efecte secundare nocive ale formulărilor topice. Apariția reacțiilor alergice la produse cosmetice este un fenomen care a luat amploare, fiind extrem de frecvente iritațiile, dermatitele de contact și fotosensibilizarea. Diverse studii au relevat că până la 10% dintre pacienții dermatologici manifestă reacții alergice la produsele farmaceutice și cosmetice. Diagnosticul alergiei cosmetice este în general confirmat prin testarea de tip „pansament ocluziv” – „patch-test”. Aceste probleme pot apărea indistinct din produse naturale sau sintetice, inclusiv deodorante și parfumuri, produse pentru îngrijirea pielii și a părului, filtre UV și produse cosmetice pentru unghii. S-a constatat, de asemenea, că dermatita de contact alergică rezultă în principal din aromele și conservanții utilizați. Prin urmare, există o mare îngrijorare cu privire la potențialul reacțiilor cutanate iritante sau alergene atunci când se dezvoltă o formulare topică, iar utilizarea componentelor hipoalergenice este un obiectiv major care trebuie urmărit de producătorii de produse cosmetice și farmaceutice. O altă sursă majoră de îngrijorare este capacitatea diversilor agenți de a promova o diferențiere anormală a epiteliului foliculului părului, rezultând în formarea de microcomedone (comedogenicitate) sau, în cazuri mai severe, insurgența foliculitei (acnegenicitate). Comedoanele sunt leziunile principale ale acneei, datorate hiperkeratinizării în conductul pilosebaceu, ceea ce duce la obstrucția parțială (comedon deschis sau punct negru) sau obstrucție completă (comedon închis sau punct alb) a conductei și acumularea sebumului. Aceste procese pot apărea în mod natural, mai ales la tineri, cu o producție crescută de androgeni (de exemplu, dehidroepiandrosterona sulfat). Mai mult decât atât, bacteriile comensale *Propionibacterium acnes* pot provoca leziuni inflamatorii (papule, pustule și noduli) în dermul din jurul comedei. Este importantă evaluarea comedogenității ingredientelor și produselor finite. Acest lucru s-a făcut frecvent folosind modele de animale, cum ar fi testul urechii de iepure (REA), dar interzicerea experimentelor pe animale pentru produse cosmetice a făcut urgent să se găsească proceduri alternative sau metode clinice, cum ar fi biopsia suprafeței pielii și imaginea fluorescenței pielii. Lista ingredientelor care au arătat diferite grade de comedogenitate este destul de extinsă și include lanolina și derivații săi, uleiuri petroleatice și minerale, uleiuri vegetale, esterii acizilor grași, cum ar fi isopropil miristatul și analogii săi, izopropil izostearat, oleat de decil, palmiat de octil sau stearat, etc., pigmenți (xantene, monoazoaniline, fluorani, indigoizi) și diverse protecții solare. Cu toate acestea, proprietățile ingredientelor unice nu pot fi traduse a priori R și R 'sunt acizi grași față de ceea ce ar putea apărea în produsul final, deoarece concentrațiile de ingrediente prezintă o mare variabilitate, vehiculele pot modifica potențialele comedogene și acnegenice, iar interacțiunile dintre ingrediente pot modifica efectele lor nocive. Prin urmare, pe lângă evaluarea separată a ingredientelor unice,

produsele finite trebuie întotdeauna testate din punct de vedere al toleranței cutanate și eficacității ca ansamblu de componente. O serie de teste specifice vor fi prezentate în capitolul următor.

Ca rezultat al **aplicării acestor principii de formulare** și a acțiunii biologice la nivel de keratinocit și fibroblast demonstrate anterior, s-au realizat următoarele produse:

1. **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 în proporție 9:1**.

2. **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.***

Formulele au fost concepute pentru a crea produse de îngrijire a pielii, cu o textură delicată nongrasă și care să confere tenului o senzație de confort, prospețime și catifelare. De asemenea s-a urmărit absorbția rapidă în piele, produsul destinat îngrijirii tenului fiind gândit ca o cremă de zi ușoară care să nu dea senzația de « ten încărcat » și peste care să se poată aplica machiajul. Ingredientele folosite au fost alese pentru a asigura o protecție împotriva factorilor externi și pentru a preveni semnele îmbătrânirii premature. Alegerea ingredientelor s-a făcut respectându-se Legea 178/2000 privind produsele cosmetice și Ordinul nr. 309/729/2001 privind ingredientele folosite în produsele cosmetice.

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 dermatocosmetice 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 aparut.

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 μg / cm^2 . Peste aceste valori fasia de plastic este suprasaturata de excesul de sebum si apar erori de masurare, iar sub 50 μg / cm^2 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 $[\text{H}^+]$ 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.

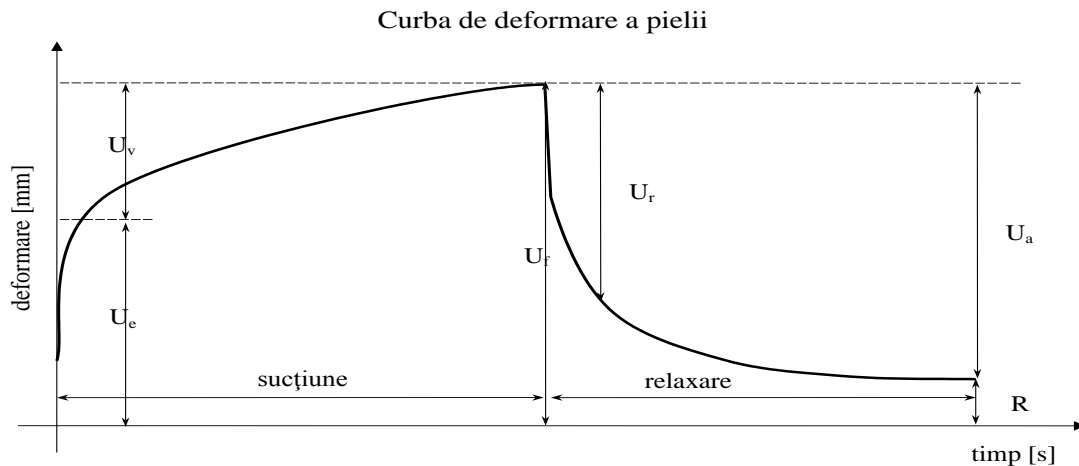
Acest tip de test se utilizeaza in special in cazul testelor de toleranta cutanata a produselor cosmetice, dar si pentru evaluarea eficientei unor produse “cu efect calmant”.

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: descumarea, 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. Vener*1992, 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:

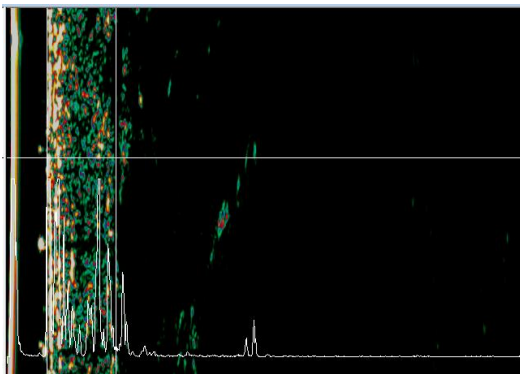


Fig. 1. Scanare modul A, derm normal

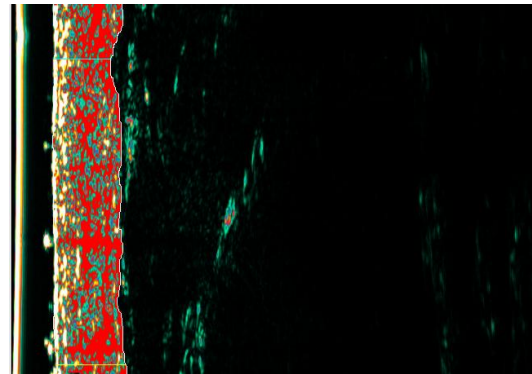


Fig. 2. Scanare modul B, derm normal

- **Degradarea si refacerea colagenului:**

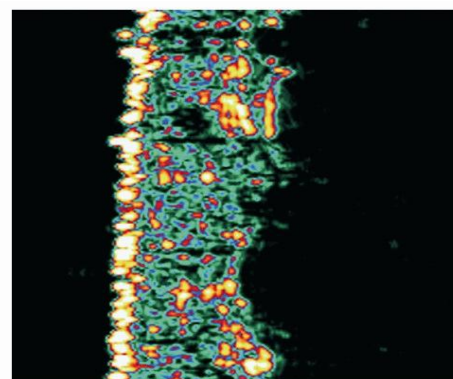
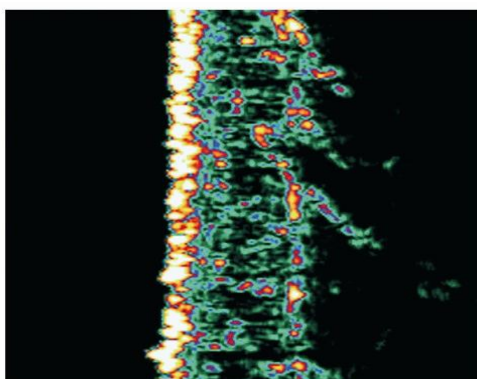


Fig. 3. Stânga (înainte de tratament): interfața cu țesutul subcutanat apare ca o linie intrerupta neregulata; structurile negre sunt celulele de grăsime și lichid limfatic. Dreapta (după terapie): țesutul a devenit mult mai compact indicând o consolidarea țesutului conjunctiv; inter-spațiile hipocogenice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

Prodot 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%	Prodotul 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. EVIDENTIEREA EFICACITATII PRODUSELOR PENTRU PROTECTIE SI REGENERARE CUTANATA

1. OBIECTIV/SCOP

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

- **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.

2. METODOLOGIA

Se vor utiliza metode instrumentale ce determina : **nivelul de hidratare al pielii** prin aplicarea metodei capacitantei in mediu dielectric (Corneometru CM 825); **parametrii de suprafata ai pielii** : rugozitatea (media dintre adancimea si latimea liniilor) si descuamarea (indica gradul de exfoliere a stratului cornos) prin ilustrarea grafica a suprafetei pielii in conditii de iluminare speciala si procesare electronica a imaginii (VisioScan VC98).

Voluntarii clinic sanatosi se vor selecta prin metoda randomizarii din baza de date generala, conform criteriilor de includere/excludere. Crema se va aplica pe o suprafata bine delimitata a zonei dorsale a antebratului. Ca agent de perturbare a echilibrului hidro-lipidic se va utiliza **dodecil sulfat de sodiu (SDS)** 10%, un detergent anionic ce actioneaza asupra lipidelor intracelulare. Doza aplicata se situeaza sub cele mentionate in Fisa de siguranta a produsului ca fiind slab iritante pentru pielea umana

Toate determinarile se realizeaza comparativ cu martorul contralateral netratat.

3. TIPUL TESTULUI : - metoda de analiza cutanata instrumentala, neinvaziva. Tipul investigatiei este "single blind" (investigatorul cunoaste produsul de testat, subiectii insa nu); Studiul este unul de tip comparativ, urmarind definirea eficacitatii produsului prin comparatie pre si post tratament cat si fata de martorul contralateral netratat.

Etapele testului vor fi urmatoarele:

- Masurarea parametrilor initiali

- 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 = $100 - (\text{Valoarea finala dupa crema} * 100 / \text{Valoarea initiala})$

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

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)_Descumare:

DESCUAMARE - SEsc - 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 (SEsc) 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 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 (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 de maini – CMR -hidrateaza stratul corneum cu aproximativ 30% fata de valorile initiale. Descuamarea si rugozitatea sunt de asemenea 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 - SEsc - 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 (SEsc) 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, descuamarea 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.**

CONCLUZII

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”, incadrat in tematica de capitalizare si exploatare functionala a reziduurilor din vinificatie ca antioxidanti in industrie, definitiveaza o serie de cercetari privind efecte moleculare si celulare ale principiilor active componente si transfera rezultatele acestora in tehnologii de formulare de laborator pentru produse dermato-cosmetice si studii de biocompatibilitate si eficacitate cutanata.

Complexitatea acestor activitati a fost abordata prin modele experimentale interdisciplinare, „in vitro” si „in vivo”, de caracterizare a principalelor mecanisme de propagare a stressului oxidativ, inflamatiei si regenerarii celulare si moleculare cutanate, in interdependenta cu actiunea compusilor bioactivi din deseuri de struguri (TES), singurari sau in asociere cu flavone si polifenoli din galbenele (Gb) si castan (Cs).

Abordarile experimentale si integrarea corelativa a rezultatelor au condus la evidentierea unor efecte concludente privind implicarea acestor compusi in procese particularizate din cai de progresie ale:

- **Stressului oxidativ:** enzime antioxidante, radicali liberi oxigenati, glutatation intracelular ca molecula de sustinere a protectiei celulare intrinseci - *efect remarcabil TES, potentat de Gb si Cas in proportii bine definite (1:9, respectiv 1:1).*
- **Inflamatiei** induse de stimuli sistemici (TNF α), pro-oxidanti (PMA) sau bacterieni (LPS) – *efect preponderent al Cs, sustinut de TES si Gb.*
- **Regenerarii cutanate** prin stimularea sintezei de colagen dermic si inhibarea enzimelor degradative MMP2 si MMP9 la nivel dermic si epidermic. – *efect marcant al Gb in combinatie cu TES si Cs in raport 9:1 si 1:1.*

Rezultatele au fost extrapolate in concepte moderne de formulare dermatocosmetica concretizate in dezvoltarea la nivel de laborator a unor produse originale de uz topic, cu adresabilitate in regenerarea pielii:

- **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.*

Evaluarea compatibilitatii cu pielea umana si a efectului de produs au demonstrat *absenta potentialului iritant si efectul regenerator cutanat* prin: restabilirea hidratarii, scaderea descumarii si a rugozitatii induse de tratamentul local de scurta durata cu SDS 10% - detergent cu efect agresiv la nivel de strat hidro-lipidic epidermal.

Rezultatele concrete si cuantificabile obtinute au dus la redactarea unei cereri de brevet cu titlul: „PRODUSE DERMATOCOSMETICE OBTINUTE PRIN ASOCIEREA UNUI EXTRACT DIN DESEURI DE STRUGURI CU EXTRACTE DIN PLANTE, CU APLICABILITATE IN REGENERARE CUTANATA SI PROTECTIE ANTIOXIDANTA” si a unei lucrari: Luiza M. CRĂCIUN, Brandusa G. DUMITRIU, Diana M. ENE, Raluca PAPACOCEA, Abdi ADIL, Laura Olariu, Natalia ROSOIU *Oxidative stress – trigger of cutaneous degenerative processes; modulation with active principles from aesculus hippocastanum, calendula officinalis and vitis vinifera*, Academy of Romanian Scientists Annals - Series on Biological Sciences, Vol. 8, No.2, (2019).

BIBLIOGRAFIE

1. Barry BW. 1991. Lipid–protein partitioning theory of skin penetration enhancement. *J Control Release* 15:237–48.
2. Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER. 1982. Methods for in vitro absorption studies. Part II. Animal models for human skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 62:481–88.
3. Buchmann S. 2001. Main cosmetic vehicles. In *Handbook of cosmetic science and technology*, ed. AO Barel, M Paye, HI Maibach, 145–69. New York: Marcel Dekker.
4. Burgess CM, ed. 2005. *Cosmetic dermatology*. Berlin: Springer-Verlag.
5. COLIPA Guidelines. 1995. Cosmetic ingredients. In *Guidelines for percutaneous absorption/penetration*, ed. R Macmillian, 1–36. Brussels: COLIPA.
6. Dembitsky VM. 2004. Astonishing diversity of natural surfactants. 1. Glycosides of fatty acids and alcohols. *Lipids* 39:933–53.
7. Dembitsky VM. 2005. Astonishing diversity of natural surfactants. 3. Carotenoid glycosides and isoprenoid glycolipids. *Lipids* 40:535–57.
8. Dembitsky VM. 2006. Astonishing diversity of natural surfactants. 4. Fatty acid amide glycosides, their analogs and derivatives. *Lipids* 40:641–60.
9. Dembitsky VM. 2006. Astonishing diversity of natural surfactants. 7. Biologically active hemi- and monoterpenoid glycosides. *Lipids* 41:1–27.
10. Draelos ZD. 2001. Botanicals as topical agents. *Clinics Dermatol* 19:474–77.
11. Draelos ZD, DiNardo JC. 2006. A re-evaluation of the comedogenicity concept. *J Am Acad Dermatol* 54:507–12.
12. Dubourdieu A, Lemirre E. 2002. *Corps Romains*. Grenoble: Jérôme Millon. © 2010 by Taylor and Francis Group, LLC *Herbal Cosmetic Formulations* 39
13. Dweck AC. 2003. Natural preservatives. *Cosmetics Toiletries* 118:45–50.
14. Ekong EA, Melbouci M, Lusvardi K, Erazo-Majewicz PE. 2001. Rheological additives and stabilizers. In *Handbook of cosmetic science and technology*, ed. AO Barel, M Paye, HI Maibach, 377–87. New York: Marcel Dekker.
16. Grace R. 2002. Cosmeceuticals: Functional food for the skin. *Natural Foods Merchandiser* 23:92–99.
17. Hostettmann K, Marston A. 1995. *Saponins*. Cambridge: Cambridge University Press.
18. Huang WS, Lin CC, Huang MC, Wen KC. 2002. Determination of α -hydroxyacids in cosmetics. *J Food Drug Anal* 10:95–100.
19. Katz M. 1973. Design of topical drug products: Pharmaceuticals. In *Drug design*, ed. EJ Ariens, 93–148. New York: Academic Press.

20. Lee SJ, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. 1998. Antiinflammatory activity of *Lonicera japonica*. *Phytother Res* 12:445–47.
21. Lucas A, Harris JR. 1961. *Ancient Egyptian materials and industries*. London: Edward Arnold and Co.
22. Lupo MP. 2001. Antioxidants and vitamins in cosmetics. *Clinics Dermatol* 19:467–73.
23. Manniche L. 1999. *Sacred luxuries: Fragrance, aromatherapy & cosmetics in ancient Egypt*. Ithaca, NY: Cornell University Press.
24. Moss GP, Dearden JC, Patel H, Cronin MTD. 2002. Quantitative structure–permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. *Toxicol In Vitro* 16:299–317.
25. Nomura H, Fusao K, Sugimoto Y, Miyashita Y, Dohi M, Kato Y. 1990. Percutaneous absorption of indomethacin from mixtures of fatty alcohol and propylene glycol (FAPG bases) through rat skin: Effects of oleic acid added to FAPG base. *Chem Pharm Bull* 38:1421–24.
26. Orton DI, Wilkinson JD. 2004. Cosmetic allergy: Incidence, diagnosis, and management. *Am J Clin Dermatol* 5:327–37.
27. Oumeish OY. 2001. The cultural and philosophical concepts of cosmetics in beauty and art through the medical history of mankind. *Clinics Dermatol* 19:375–86.
28. Rieger MM. 1990. Cosmetics and their relation to drugs. In *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, ed. J Swarbrick, JC Boylan, 361–73. Vol. 3. New York: Marcel Dekker.
29. Rieger MM, Rhein LD, eds. 1997. *Surfactants in cosmetics*. Surfactant Science Series, Vol. 68. New York: Marcel Dekker.
30. Ruiz MA, Navarro J De D, Gallardo V. 1999. Dermatological applications of olive oil. *J Appl Cosmetol* 17:19–22.
31. Schueller R, Romanowsky P. 1998. Gels and sticks. *Cosmetics Toiletries Mag* 113:43–46.
32. Sugarman JL. 2008. The epidermal barrier in atopic dermatitis. *Semin Cutaneous Med Surg* 27:108–14.
33. Surber C, Smith EW. 2005. The mystical effects of dermatological vehicles. *Dermatology* 210:157–68.
34. Van Hal DA, Jeremiasse E, Junginger HE, Spies F, Bouwstra JA. 1996. Structure of fully hydrated human stratum corneum: A freeze fracture electron microscopy study. *J Invest Dermatol* 106:89–95.
35. Verdier-Sevrain S, Bonte F. 2007. Skin hydration: A review on its molecular mechanisms. *J Cosmetic Dermatol* 6:75–82. © 2010 by Taylor and Francis Group, LLC 40 *Herbal Principles in Cosmetics*

36. Williams AC, Barry BW. 1989. Essential oils as novel human skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 57:R7–R9.
 37. Williams AC, Barry BW. 2004. Penetration enhancers. *Adv Drug Delivery Rev* 56:603–18.
 38. Xu X, Mariano TM, Laskin JD, Weisel CP. 2002. Percutaneous absorption of trihalomethanes, haloacetic acids, and haloketones. *Toxicol Appl Pharmacol* 184:19–26.
 39. Zülfi F, Suter F. 1997. Preparation and properties of small nanoparticles for skin and hair care. *Seifen Oele Fette Wachse J* 123:880–85.
 40. *Herbal Principles in Cosmetics* © 2010 by Taylor and Francis Group, LLC
 41. Legea nr. 178/2000 cu modificarile ulterioare privind produsele cosmetice
 42. International Conference on Harmonisation (ICH) – Guidelines for Good Clinical Practice, 2000
 43. CosmetLex - Rules Governing Cosmetic products in the European Union , 1999
 44. Colipa. Assessment of skin tolerance of potentially irritant cosmetic ingredients, 1997
 45. Colipa. Guidelines for the safety assessment of a cosmetic product, 1997
 46. FDA – Dermatological guidelines: Skin irritation and sensitization of generic transdermal products, 1999.
 47. EMEA – Notes for guidances in Dermatology
 48. Spiewak R. Patch testing for contact allergy and allergic contact dermatitis. *Open Allergy J* 2008; 1: 42-51.
- (c) Radoslaw Spiewak