
TEZĂ DE DOCTORAT

Toleranța cutanată a unor
formulări cosmetice anti-ageing
conținând ingrediente active
inovatoare

Doctorand **Anca-Maria Juncan**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"IULIU HAIEGANU"
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

| | |
|---|---|
| INTRODUCERE | 3 |
| STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII | 3 |
| CONTRIBUȚIA PERSONALĂ | 3 |
| 1. Ipoteza de lucru/obiective | 3 |
| 2. Studiu 1. Dezvoltarea formulărilor cosmetice complementare cu efect asupra ageing-ului cutanat | 4 |
| 2.1. Introducere | 4 |
| 2.2. Ipoteza de lucru și obiective | 4 |
| 2.3. Material și metodă | 4 |
| 2.4. Rezultate și discuții | 4 |
| 2.5. Concluzii | 6 |
| 3. Studiu 2. Controlul calității formulărilor cosmetice dezvoltate – Studii de stabilitate, caracteristici fizico-chimice și testarea microbiologică | 5 |
| 3.1. Introducere | 5 |
| 3.2. Ipoteza de lucru și obiective | 5 |
| 3.3. Material și metodă | 5 |
| 3.4. Rezultate și discuții | 5 |
| 3.5. Concluzii | 5 |
| 4. Studiu 3. Evaluarea siguranței și a toleranței cutanate a formulărilor dezvoltate prin metode <i>in silico</i> și <i>in vivo</i> | 5 |
| 4.1. Introducere | 5 |
| 4.2. Ipoteza de lucru și obiective | 6 |
| 4.3. Material și metodă | 6 |
| 4.4. Rezultate și discuții | 6 |
| 4.5. Concluzii | 7 |
| 5. Studiu 4. Evaluarea eficacității formulărilor cosmetice dezvoltate | 7 |
| 5.1. Introducere | 7 |
| 5.2. Ipoteza de lucru și obiective | 7 |
| 5.3. Material și metodă | 7 |
| 5.4. Rezultate și discuții | 7 |
| 5.5. Concluzii | 8 |
| 6. Concluzii generale | 8 |
| 7. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei | 8 |
| Bibliografie selectivă | 9 |

Cuvinte cheie: formulări anti-ageing, ingrediente cosmetice anti-ageing, acid hialuronic, evaluarea siguranței, metode *in silico*, toleranță cutanată, studii de eficacitate

INTRODUCERE

Creșterea ponderii populației vârstnice la nivel mondial și totodată progresele tehnologice din industria cosmetică, reprezintă factori esențiali, care stimulează creșterea pieței produselor anti-îmbătrânire. Produsele antirid câștigă o importanță deosebită prin formulări inovatoare, pentru ameliorarea și încetinirea procesului ageing-ului cutanat.

Cadrul legislativ al produselor cosmetice, respectiv Regulamentul (CE) nr. 1223/2009 al Parlamentului European și al Consiliului din 30 noiembrie 2009 privind produsele cosmetice, evidențiază importanța evaluării siguranței produselor cosmetice și aspectele generale care garantează calitatea, eficacitatea și siguranța acestora (1).

Varietatea, atât din punct de vedere al structurii chimice, cât și al mecanismului de acțiune al unor ingrediente cu rol regenerant, hidratant sau anti-ageing dezvoltate și disponibile comercial în ultima perioadă, duce la o diversitate de formulări cosmetice care necesită verificarea compatibilității și a toleranței cutanate și totodată a eficacității acestora (2).

Scopul principal al acestui studiu a fost dezvoltarea și formularea unor produse cosmetice complementare, destinate special profilaxiei ageing-ului cutanat. Formulările cosmetice dezvoltate încorporează acid hialuronic (HA) cu diferite greutăți moleculare și alte ingrediente active, în această combinație unică conferind o hidratare optimă a tegumentului, produsele fiind considerate unele inovatoare și special concepute pentru a reduce semnele vizibile ale îmbătrânirii cutanate.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Îmbătrânirea cutanată este un fenomen multifactorial și care urmează un proces cronologic. Pe lângă factorii endogeni, diferite influențe ale mediului susțin procesul de îmbătrânire cutanată. Funcționalitatea pielii este diminuată, ceea ce poate duce la posibilitatea apariției unor diverse afecțiuni cutanate, care influențează substanțial calitatea vieții. Cunoașterea fiziopatologiei îmbătrânirii tegumentului și luarea unor măsuri de precauție pentru a preveni deteriorarea organului cutanat, reprezintă un pas inițial în scopul asigurării unui proces de îmbătrânire sănătos (3). O stare de sănătate optimă include generic îmbunătățirea aspectului pielii îmbătrânite, cu posibilitatea de a utiliza atât ingrediente active sigure și eficiente, cât și produse și proceduri cosmetice cu scopul diminuării aspectului inestetic al tegumentului (4).

Tendențele actuale în cosmetologie se bazează pe formulări și produse care utilizează substanțele proprii ale corpului uman. Din categoria acestora face parte și HA, datorită capacității sale ridicate de a lega cantități însemnate de apă, care ar trebui să asigure hidratarea tegumentului, în special a straturilor profunde ale acestuia, îmbunătățind astfel elasticitatea pielii. A fost studiat și descris anterior efectul HA de stimulare a fibroblastelor și prin urmare, formarea de colagen și elastină (5).

Având în vedere că în ultima perioadă acidul hialuronic are o utilizare largă și o multitudine de aplicații biomedicale, evaluarea principalelor aspecte referitoare la aplicațiile acestuia în cosmetologie prezintă un interes semnificativ, considerând efectul biologic al HA la nivel cutanat și potențialele sale efecte adverse.

Unele formulări cosmetice care încorporează în formulare HA și sunt disponibile comercial, pretind ca efect revendicat hidratarea și redarea elasticității pielii; acești parametri biofizici sunt în strânsă legătură cu efectul antirid, dar nici o dovadă științifică riguroasă nu justifică complet această afirmație. Eficacitatea acidului hialuronic depinde în mare măsură de masa moleculară a acestuia. Principala acțiune a HMW-HA este aceea de polimer formator de film, acesta reducând evaporarea apei la nivelul tegumentului și posedând astfel acțiune ocluzivă. Pe de altă parte, MMW-HA și LMW-HA au proprietăți higroscopice, ceea ce justifică capacitatea de a menține efectul de hidratare a pielii (6,7). HA și sărurile acestuia (hialuronatul de sodiu și de potasiu) sunt ingrediente active importante, care sunt încorporate preponderent în produsele cu efect hidratant și anti-îmbătrânire. În principal, produsele cu HA hidrolizat reprezintă doar 5% și mai mult de 95% din totalul acestora conțin în formulare derivatul HA, hialuronat de sodiu (NaHA) (8,9).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective

Utilizarea ingredientelor active inovatoare și totodată diversitatea produselor cosmetice care susțin efectul anti-ageing sunt dovezi concludente că industria cosmetică se bazează la momentul de față în mare măsură pe aceste

ingrediente (8).

Obiectivul principal al cercetării a fost dezvoltarea și formularea unor produse cosmetice complementare încorporând HA de diferite greutăți moleculare, NaHA microîncapsulat, împreună cu alte ingrediente active inovatoare, pentru tratamentul adjuvant al ageing-ului cutanat, și totodată evaluarea siguranței, din perspectiva toleranței și a compatibilității cutanate, dar și a eficacității formulărilor dezvoltate.

Efectele formulărilor cosmetice se bazează pe o combinație de ingrediente active inovatoare - acid hialuronic cu greutate moleculă mică (LMW-HA) sau medie (MMW-HA), hialuronat de sodiu (NaHA) microîncapsulat, ectoină, microcapsule cu aur sau vitaminele A și E și un complex vegetal cu efect anti-îmbătrânire, care contribuie la o hidratare optimă a pielii, special concepută pentru a reduce semnele vizibile ale ageing-ului cutanat, cu precădere la nivelul zonei periorbitale.

Cu scopul de a demonstra calitatea formulărilor dezvoltate, au fost efectuate evaluări privind stabilitatea accelerată, controlul microbiologic, fiind inclusă testarea eficacității conservantului (testări de tip Challanage), precum și caracteristicile fizico-chimice.

Un alt obiectiv important al studiului a fost evaluarea siguranței formulărilor cosmetice prin identificarea riscurilor ingredientelor individuale. În acest sens, au fost utilizate metode *in silico* cu scopul a demonstra siguranța și de a evalua riscul ingredientelor și al formulărilor cosmetice dezvoltate. Compatibilitatea cutanată și efectul declarat al formulărilor cosmetice au fost demonstrate prin evaluări *in vivo*, respectiv prin determinări instrumentale.

O metodologie combinată de evaluare a riscului este imperios necesară, având în vedere faptul că utilizarea exclusivă a metodelor alternative de testare nu permite o apreciere corectă a securității ingredientelor/formulărilor multicomponente, acesta reprezentând principalul dezavantaj în comparație cu testarea *in vivo*.

2. Studiu 1. Dezvoltarea formulărilor cosmetice complementare cu efect asupra ageing-ului cutanat

2.1. Introducere

Formulările cosmetice conțin o combinație de ingrediente, în funcție de categoria produsului, cu diferite proprietăți și funcții, ca de exemplu emolienți, emulgatori, conservanți, umectanți, agenți tensioactivi, parfumuri, coloranți și, uneori, extracte vegetale. Deși, în general, produsele cosmetice sunt sigure pentru sănătatea umană, o subpopulație poate dezvolta reacții alergice (10). Dezvoltarea industriei cosmetice, împreună cu elaborarea și îmbunătățirea legislației menite să protejeze consumatorul, au contribuit la creșterea credibilității cosmetologiei și a produselor cosmetice în fața consumatorilor.

2.2. Ipoteza de lucru și obiective

Informații privind siguranța ingredientelor cosmetice sunt publicate în diverse baze de date, precum CosIng (Cosmetic Ingredient database) și Cosmetic Ingredient Review (CIR) și împreună cu datele obținute din fișa tehnică de siguranță (MSDS – Material Safety Data Sheet) pot reprezenta surse importante pentru selecția ingredientelor din formulările cosmetice.

2.3. Material și metodă

Pe baza studiului fișelor tehnice de siguranță (MSDS - Material Safety Data Sheet) a fost efectuată o ierarhizare și încadrare a materiilor prime studiate, pentru a avea un fundament solid în ceea ce privește selecția materiilor prime pentru bazele formulărilor dezvoltate - emulgatori, emolienți, modificatori de vâscozitate, modificatori de pH, conservanți, etc.. Formulările cosmetice dezvoltate au fost denumite generic „Cremă anti-ageing”, „Emulsie demachiantă anti-ageing”, „Ser anti-ageing”, respectiv „Cremă regenerantă”.

Ca ingrediente active au fost selectate HA cu diferite greutăți moleculare și NaHA microîncapsulat, împreună cu un complex natural cu efecte anti-ageing – Fructose/Glycerin/Aqua/ *Aesculus Hippocastanum* (Horse Chestnut) Extract, precum și microcapsule cu aur de 22k, ectoină și un pigment cu efect matifiant și anti-ageing într-o cremă cu efect anti-ageing și microcapsule cu Vitamina E și A într-o formulare cu efect regenerant. Totodată, trei dintre emulsiile formulate (crema anti-ageing, crema regenerantă și emulsia demachiantă) conțin un complex de ceruri naturale, cu efect emolient, hidratant și cu rol esențial în refacerea barierei hidro-lipidice a pielii.

Totodată, cu același scop, și anume acela al selecției ingredientelor cosmetice, informațiile disponibile privind nivelul de siguranță și limita de concentrație la care ingredientul individual este considerat sigur pentru utilizarea în formularea cosmetică, au fost preluate din bazele de date CosIng, CIR și COSMILE Europe (11-13).

Pe baza ingredientelor selectate și în funcție de tipul formulării cosmetice au fost dezvoltate cele patru formulări cosmeceutice (14,15).

2.4. Rezultate și discuții

În acest studiu au fost selectate ingrediente inovatoare cu scopul dezvoltării unor formulări cosmetice complementare pentru ameliorarea ageing-ului cutanat.

Selecția ingredientelor active din formulările dezvoltate s-a bazat pe efectul revendicat al produsului finit, utilizându-se HA cu diferite greutate moleculare și sub formă încapsulată, împreună cu alte ingrediente active, care pot determina efecte benefice complementare - un complex vegetal, ectoină, microcapsule cu Au sau vitaminele A și E, în funcție de categoria formulării dezvoltate.

În formulările cosmetice LMW-HA stimulează sinteza proteinelor de la nivelul joncțiunii dermoepidermale, susține hidratarea tegumentului și stimulează sinteza colagenului de tip I, asigurând fermitatea cutanată. MMW-HA crește proliferarea fibroblastelor și a keratinocitelor, susținând procesul de regenerare celulară a pielii. Complexul vegetal pe bază flori de *Aesculus Hippocastanum*, bogat în flavonoide, conferă proprietatea de reducere a ridurilor periorbitale și efect antirid prin susținerea integrității joncțiunii dermoepidermale, precum și creșterea sintezei de colagen de tip IV și VII, dovedind un efect regenerant și nutritiv.

2.5. Concluzii

În acest studiu au fost selectate ingrediente de tip emolient, emulgator, modificator de vâscozitate, conservant și active inovatoare, selectate atât pentru compatibilitatea în formulare, cât și pentru stabilitatea formulărilor cosmetice. Bazele de date precum CosIng, CIR și/sau COSMILE pot fi considerate utile pentru selecția ingredientelor din formulările cosmetice. Ingredientele active au fost selectate considerând-se efectul revendicat al formulărilor cosmetice anti-ageing.

Formulările complementare dezvoltate în cadrul acestui studiu pot oferi un tratament adjuvant optim pentru îngrijirea tegumentului matur.

3. Studiu 2. Controlul calității formulărilor cosmetice dezvoltate – Studii de stabilitate, caracteristici fizico-chimice și testarea microbiologică

3.1. Introducere

Calitatea unui produs cosmetic se referă la specificațiile farmacotehnice și conformitatea acestuia, cum ar fi caracteristicile organoleptice (aspectul, culoarea și mirosul), stabilitatea, proprietățile fizico-chimice, evaluarea microbiologică etc. (16).

3.2. Ipoteza de lucru și obiective

În vederea evaluării calității formulărilor cosmetice dezvoltate au fost efectuate studii accelerate de stabilitate, precum și testări fizico-chimice și microbiologice, inclusiv testarea eficacității conservantului utilizat în cele patru formulări cosmetice dezvoltate (test Challenge).

3.3. Material și metodă

Conform reglementărilor legislative actuale, respectiv Regulamentul (EC) nr. 1223/2009 au fost efectuate o serie de testări privind controlul calității formulărilor cosmetice dezvoltate: (I) evaluarea stabilității formulărilor cosmetice (17-19); (II) testări fizico-chimice, control organoleptic (aspect, culoare, miros) și determinarea pH-ului și a densității formulărilor cosmetice (20,21); (III) testarea microbiologică în vederea evaluării contaminării microbiene a formulărilor dezvoltate și a eficacității conservantului (test Challenge) (14,15,22,23).

3.4. Rezultate și discuții

Având în vedere caracteristicile de calitate, au fost efectuate determinări pentru a evalua proprietățile fizico-chimice și farmacotehnice ale formulărilor dezvoltate. Rezultatele au confirmat stabilitatea formulărilor cosmetice în cadrul studiilor în condițiile efectuate și au demonstrat proprietăți fizico-chimice adecvate.

Rezultatele determinărilor microbiologice au confirmat calitatea microbiologică a formulărilor dezvoltate. Conform rezultatelor studiilor Challenge au fost confirmate eficacitatea conservantului și concentrația acestuia în cele patru formulări cosmetice și protecția antimicrobiană.

3.5. Concluzii

Rezultatele acestui studiu cu privire la controlul calității formulărilor cosmetice dezvoltate, au confirmat, conform testărilor de stabilitate și a evaluării caracteristicilor fizico-chimice, preparate cosmetice acceptabile, cu un aspect optim și caracteristici fizico-chimice adecvate. Totodată, conformitatea cu specificațiile microbiologice, inclusiv evaluarea eficacității conservantului utilizat în formulările cosmetice, au demonstrat calitatea formulărilor cosmetice dezvoltate.

4. Studiu 3. Evaluarea siguranței și a toleranței cutanate a formulărilor dezvoltate prin metode *in silico* și *in vivo*

4.1. Introducere

În ceea ce privește produsele cosmetice, termenul de "evaluare a riscului" este adesea înlocuit cu cel de

"evaluare a siguranței", pentru a demonstra proprietățile sigure ale ingredientelor și formulărilor cosmetice (1,24). Ca urmare a implementării integrale a Regulamentului privind produsele cosmetice nr. 1223/2009 în anul 2013, cu interzicerea testării și a comercializării ingredientelor cosmetice și a produselor finite testate pe animale, industria cosmetică este motivată să aplice abordări care nu implică utilizarea animalelor de experiență, metode care sunt cunoscute sub denumirea de metode alternative de testare (New Approach Methodologies (NAM) sau Next Generation Risk Assessment (NGRA)), cum ar fi evaluările *in vitro*, *in chemico* și *in silico*, pentru a genera date toxicologice (25).

4.2. Ipoteza de lucru și obiective

Utilizarea adecvată a modelelor *in silico* poate reprezenta o alternativă utilă a testării pe animale, cu scopul evaluării toxicității ingredientelor cosmetice, cu respectarea cadrului legislativ actual. Evaluarea *in silico* trebuie să fie integrată cu alte dovezi și evaluări (de exemplu date *in vitro* și/sau *in vivo*), sub forma unei metodologii complexe, pentru a demonstra siguranța unui ingredient/produs cosmetic.

Obiectivul acestui studiu a fost de a propune și de a aplica o metodologie complexă de evaluare a siguranței pentru formulările cosmetice dezvoltate, pe baza ingredientelor formulării și totodată de a confirma compatibilitatea cutanată a formulărilor pe baza unei evaluări *in vivo*.

4.3. Material și metodă

Un software nou pentru caracterizarea hazardului și a expunerii, cu scopul determinării riscului ingredientelor cosmetice (SpheraCosmolife v. 0.24) a fost utilizat pentru evaluarea *in silico* a ingredientelor din formulările cosmetice dezvoltate. Astfel, sunt calculate expunerea externă (cutanată) și expunerea internă (doza de expunere sistemică) prin modelarea K_p (coeficientul de permeabilitate cutanată), confirmând lipsa riscului unui ingredient de a produce efecte toxice în urma expunerii. Sistemul selectează valori experimentale pentru NOAEL (No Observed Adverse Effect Level - nivelul la care nu se observă efecte adverse), oferă valori previzionate de model, calculând marja de siguranță (MoS) și pragul de avertizare toxicologică (Threshold of Toxicological Concern TTC) (14,15,26).

Scopul testărilor cutanate Semi-open a fost evaluarea proprietăților iritante (toleranța cutanată) ale formulărilor cosmetice dezvoltate, aplicate sub patch pe pielea adultă. În cadrul studiilor a fost evaluat nivelul eritemului și al edemului după aplicarea formulărilor cosmetice - la 48 de ore și respectiv la 72 de ore de la aplicarea produsului pe pielea subiecților înscriși în studiu (27-29).

Studiul privind toleranța cutanată a formulărilor dezvoltate a fost efectuat în cadrul testelor de uzaj sub control dermatologic. Prin acest studiu s-a urmărit evaluarea toleranței cutanate pe zona de aplicare a formulărilor cosmetice dezvoltate, după aplicare repetată, timp de 28 de zile în condiții normale de utilizare a produsului cosmetic (30-32).

4.4. Rezultate și discuții

Rezultatele sunt corelate cu categoria de produs cosmetic și cu intervalul de concentrație al ingredientelor introduse în software-ul utilizat. Astfel, sunt prezentate caracteristicile privind hazardul și cele de expunere ale ingredientelor formulărilor dezvoltate. Totodată, rezultatele includ următoarele informații: (i) prezența unui ingredient într-una din anexele Regulamentului privind produsele cosmetice, (ii) mutagenitatea (testul Ames), (iii) sensibilizarea cutanată, (iv) absorbția cutanată (în conformitate cu abordarea Kroes), (v) MoS și (vi) TTC.

Pentru a demonstra siguranța ingredientelor din formulările cosmetice dezvoltate, a fost efectuată o caracterizare a riscului, având în vedere toxicitatea sistemică și MoS. De asemenea, software-ul a redat o evaluare care utilizează abordarea TTC, aceasta fiind calculată conform clasificării Cramer (Toxic hazard classification by Cramer) și adaptată pentru ingredientele cosmetice, calculată de SpheraCosmolife: Clasa I - toxicitate redusă (0,046 mg/kgbw/zi) și clasa II - toxicitate medie (0,023 mg/kgbw/zi).

Concentrațiile ingredientelor restricționate din formulările dezvoltate, cum ar fi conservanții și filtrele UV, au fost în conformitate cu cele recomandate în Regulamentul (CE) nr. 1223/2009 și, prin urmare, pot fi considerate a fi sigure. Software-ul utilizat a furnizat date importante pentru identificarea și caracterizarea riscului de mutagenitate și sensibilizare cutanată, în special pentru ingredientul activ HA hidrolizat (o combinație de LMW- și MMW-HA) cu o concentrație de 0,7% într-o formulare cosmetică recomandată special pentru zona periorbitală (Serul anti-ageing), care a prezentat proprietăți de sensibilizare cutanată redusă.

Testările cutanate au evidențiat că formulările cosmetice dezvoltate și evaluate din punct de vedere al toleranței cutanate nu au provocat hipersensibilitate. În panelurile de subiecți testați nu au fost observate iritații sau reacții alergice, ceea ce evidențiază că formulările dezvoltate îndeplinesc criteriile de compatibilitate cutanată, iar formulările cosmetice au fost clasificate ca fiind "neiritante" în funcție de Xav (Indice mediu de iritație (Xav) determinat ca sumă a reacțiilor negative (eritem și edem)), demonstrând-se toleranța cutanată a acestora.

Pe baza examenului clinic al subiecților înscriși în studiile privind evaluarea compatibilității cutanate sub control dermatologic, s-a demonstrat că formulările cosmetice dezvoltate au fost foarte bine tolerate pe zona de

aplicare a produsului. În cazul tuturor subiecților care au finalizat studiile (pentru Crema anti-ageing subiectul 2 a finalizat studiul în ziua 24 și subiectul 6 nu a finalizat studiul, iar pentru Serul anti-ageing subiecții 2 și 9 nu au finalizat studiul), după aplicarea repetată a formulării cosmetice aceștia nu au declarat simptome/reacții adverse care ar putea indica intoleranță cutanată (iritație, senzație de arsură, eritem sau prurit), la nici un ingredient din formulare.

4.5. Concluzii

A fost aplicată o metodologie de evaluare complexă pentru a demonstra siguranța formulărilor cosmetice dezvoltate prin identificarea și evaluarea riscului ingredientelor individuale cu ajutorul metodelor *in silico* și a compatibilității cutanate prin studii *in vivo*.

Cu ajutorul software-ului utilizat s-au obținut date valoroase cu privire la sensibilizarea cutanată, în special pentru HA hidrolizat (o combinație de LMW-HA și MMW-HA) care, în concentrația propusă de 0,7% într-una dintre formulările cosmetice destinate zonei periorbitale (Serul anti-ageing), a prezentat proprietăți de sensibilizare cutanată reduse. Concentrațiile ingredientelor restricționate, fenoxietanol - conservant și butilmetoxidibenzoilmetan ca filtru UVA au fost în conformitate cu cele recomandate în anexele Regulamentul (CE) Nr. 1223/2009 și prin urmare au fost considerate și confirmate a fi sigure.

Conform studiilor de siguranță pentru formulările dezvoltate, s-a evaluat toleranța cutanată și s-a verificat absența potențialului alergen al produselor cosmetice după aplicare unică sub patch sau după aplicarea repetată în condiții normale de utilizare. S-a evidențiat că formulările dezvoltate sunt bine tolerate pe tegument, nici unul dintre subiecții înscriși în studiu nemanifestând iritații sau reacții alergice, astfel încât formulările cosmetice dezvoltate întrunesc toate cerințele cu privire la toleranța și compatibilitatea cutanată și pot fi clasificate ca „neiritante”.

5. Studiu 4. Evaluarea eficacității formulărilor cosmetice dezvoltate

5.1. Introducere

Eficacitatea unui produs cosmetic poate fi definită drept capacitatea de a furniza efectul dorit sau revendicat. Ingredientele active asigură eficacitatea unei formulări cosmetice pentru obținerea rezultatului dorit, împreună cu excipienții selectați corespunzător, în funcție de forma de condiționare a acesteia (33–35).

5.2. Ipoteza de lucru și obiective

Declarațiile referitoare la formulările cosmetice trebuie să fie în conformitate cu definiția produselor cosmetice dată de către Regulamentul nr. 1223/2009 și să respecte anumite criterii privind veridicitatea și corectitudinea acestora în concordanță cu aspectele legislative actuale. Efectele revendicate privind eficacitatea produselor cosmetice trebuie să fie susținute de dovezi științifice (Art. 11 și Art. 20 al Regulamentului Nr. 1223/2009).

Pentru a demonstra efectele revendicate ale formulărilor dezvoltate, un alt studiu esențial a fost evaluarea claim-ului cosmetic al celor patru formulări cosmetice dezvoltate prin studii instrumentale.

5.3. Material și metodă

Pentru formularea Cremei anti-ageing s-a efectuat un studiu instrumental asupra reducerii lungimii și adâncimii ridurilor (Visioline® VL 650, Courage + Khazaka, Köln, Germania) (15).

Metoda de testare a factorului de protecție solară pentru Crema anti-ageing a utilizat un simulator solar cu lampă cu arc de xenon (Solar Light type Single Port 16S-150-001, detector Solar Light Co. Erythema DCS detector PMA2105, Solar Light Co., USA), pentru a determina protecția oferită de produsul cu protecție solar aplicat pe pielea umană împotriva eritemului indus de radiațiile UV (15,36,37).

Pentru Crema regenerantă s-a evaluat pierderea de apă transepidermică (TEWL), respectiv funcția barierei cutanate prin tewametrie (Tewameter® TM 300, Courage + Khazaka, Köln, Germania) (38,39).

Pentru Emulsia demachiantă anti-ageing a fost evaluată elasticitatea și fermitatea cutanată prin cutometrie (Cutometer® MPA 580, Courage + Khazaka, Köln, Germania) (33,40–42).

Pentru formularea Ser anti-ageing s-a efectuat un studiu instrumental asupra reducerii lungimii și adâncimii ridurilor (Visioline® VL 650, Courage + Khazaka, Köln, Germania) (43–45).

Pentru o evaluare complexă a eficacității celor patru formulări dezvoltate, au fost realizate studii de autoevaluare pe baza unor chestionare privind aprecierea subiecților cu privire la calitatea cosmetică și eficacitatea produsului testat (15).

5.4. Rezultate și discuții

Prin analiza microreliefului cutanat s-a demonstrat că, Crema anti-ageing reduce lungimea ridurilor (67% subiecți incluși în studiu cu răspunsuri pozitive, $\Delta = -8\%$) și adâncimea ridurilor (78% subiecți incluși în studiu cu răspunsuri pozitive, $\Delta = -6\%$). În urma evaluării SPF s-a demonstrat că valoarea medie a SPF pentru Crema anti-ageing este 16.0, astfel încât valoarea SPF care poate fi revendicată pentru formularea cosmetică dezvoltată (cf.

2006/647/CE) este de 15 (protecție medie).

În urma evaluării instrumentale prin tewametrie, pentru Crema regenerantă s-a demonstrat că formularea are efect de regenerare a barierei hidro-lipidice a tegumentului.

În urma evaluării instrumentale prin cutometrie, respectiv prin măsurarea parametrilor R2 (elasticitate) și R0 (fermitate), pentru Emulsia demachiantă anti-ageing s-a demonstrat că formularea cosmetică are efect de îmbunătățire a elasticității și fermității tegumentului.

Prin analiza microreliefului cutanat s-a demonstrat că Serul anti-ageing reduce lungimea ridurilor (57% subiecți incluși în studiu cu răspunsuri pozitive, $\Delta = -1\%$) și adâncimea ridurilor (100% subiecți incluși în studiu cu răspunsuri pozitive, $\Delta = -6\%$).

5.5. Concluzii

În cadrul acestui studiu, efectele revendicate ale formulărilor dezvoltate au fost monitorizate prin utilizarea tehnicilor bioinstrumentale, prin determinarea parametrilor biofizici care caracterizează tegumentul și revendicarea claim-ului formulărilor dezvoltate (elasticitatea sau fermitatea cutanată, pierderea de apă transepidermică), evaluarea microreliefului pielii și a ridurilor periorbitale și determinarea SPF pentru Crema anti-ageing.

6. Concluzii generale

Acidul hialuronic este unul dintre cele mai utilizate ingrediente active în formulări cosmetice, în funcție de greutatea sa moleculară și datorită efectelor sale revendicate - hidratant, regenerant și anti-ageing. Adesea, HA este utilizat în combinație cu alte ingrediente active, ca de exemplu extracte vegetale, vitamine, probiotice, aminoacizi, peptide, proteine, etc., care pot determina efecte benefice complementare ale produsului cosmetic.

În cadrul studiilor au fost dezvoltate patru formulări cosmetice complementare, pentru ameliorarea ageing-ului cutanat și a fost evaluată siguranța și eficacitatea acestora.

Din perspectiva calității formulărilor cosmetice dezvoltate, rezultatele au confirmat, prin testele de stabilitate și caracteristicile fizico-chimice, că preparatele cosmetice sunt acceptabile, cu aspect optim și caracteristici fizico-chimice adecvate. Conformitatea cu specificațiile microbiologice, inclusiv evaluarea eficacității conservantului utilizat în formulările cosmetice (testări Challenge) au demonstrat calitatea formulărilor cosmetice dezvoltate.

Evaluarea siguranței ingredientelor cosmetice s-a realizat cu ajutorul metodelor *in silico*. Concentrațiile ingredientelor restricționate, ca de exemplu fenoxietanol drept conservant și butilmetoxidibenzoilmetanul utilizat ca filtru UVA într-o formulare care revendică SPF mediu, au fost în conformitate cu cele recomandate de către Regulamentul (CE) nr. 1223/2009 și prin urmare au fost considerate și confirmate ca fiind sigure. Software-ul utilizat, specific industriei cosmetice, a furnizat date valoroase cu privire la diverse efecte toxice, precum sensibilizarea cutanată.

Toleranța cutanată și absența potențialului alergen al formulărilor cosmetice după aplicare unică sub patch și după utilizarea în condiții normale a produsului au fost confirmate prin studii *in vivo*.

Efectele revendicate ale formulărilor dezvoltate au fost monitorizate prin utilizarea tehnicilor bioinstrumentale prin determinarea parametrilor biofizici care caracterizează tegumentul și revendicarea claim-ului cosmetic (elasticitate, fermitate cutanată, pierderea de apă transepidermică) și prin evaluarea microreliefului tegumentului și a ridurilor periorbitale. Pentru Crema anti-ageing dezvoltată, a fost demonstrat un SPF 15 (factor mediu de protecție solară).

Formulările cosmetice complementare și inovatoare din perspectiva combinației de ingrediente ar putea reprezenta un tratament adjuvant complex în ameliorarea ageing-ului cutanat.

7. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

Originalitatea tezei constă, în primul rând, în dezvoltarea unor formulări cosmetice complementare destinate tratamentului adjuvant al ageing-ului cutanat, incorporând acid hialuronic cu diverse mase moleculare sau microîncapsulat, într-o combinație unică cu alte ingrediente active.

În cadrul cercetărilor, a fost aplicată o metodologie de evaluare combinată, complexă și inovatoare pentru a demonstra siguranța formulărilor cosmetice dezvoltate, prin identificarea și evaluarea riscului ingredientelor individuale din formulare pe baza metodelor alternative de testare *in silico*, împreună cu confirmarea compatibilității cutanate prin evaluare *in vivo*.

Stabilirea unei metodologii corecte și concludente de evaluare din perspectiva siguranței, respectiv a eficacității și cu asigurarea unor standarde stricte de calitate, conform legislației în vigoare, a reprezentat de asemenea o abordare nouă și complexă.

Din punct de vedere al rezultatelor cercetării și al impactului științific, studiile realizate au fost publicate în reviste cu impact internațional și indexate ISI (quartilele Q1 și Q2). Pentru una din formulările cosmetice dezvoltate în cadrul cercetărilor, s-a obținut un brevet de invenție înregistrat la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM) (Cremă pentru Regenerare Celulară. Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci România; 134810 A2/2021).

Bibliografie selectivă

1. Regulamentul (CE) NR. 1223/2009 al Parlamentului European și al Consiliului din 30 Noiembrie 2009 privind Produsele Cosmetice. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/RO/TXT/HTML/?uri=CELEX:32009R1223>. Accessed January 24, 2024.
2. Farage MA, Miller KW, Maibach HI. Textbook of Aging Skin. In: Textbook of Aging Skin. 2014; 1–18.
3. Elsner P, Fluhr JW, Gehring W, Kerschner MJ, Krutmann J, Lademann J, et al. Anti-aging data and support claims--consensus statement. *JDDG*. 2011;9; Suppl 3: S1–32.
4. Ayer J, Griffiths CEM. Photoaging in Caucasians. In: Rhodes L, Sage E, Trotta M, editors. Cutaneous Photoaging. London: The Royal Society of Chemistry; 2019. 1–30.
5. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L, Coto G. Hyaluronic Acid and Wound Healing. *J Pharm Pharm Sci*. 2015;18(1):53–60.
6. Mondon P, Doridot E, Ringenbach C, Gracioso O. Hyaluronic acid: history and future potential. *Personal Care*. 2015; 6:27–30.
7. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers (Basel)*. 2018 Jun 25;10(7):701–737.
8. Juncan AM, Moisă DG, Santini A, Morgovan C, Rus LL, Vonica-Țincu AL, Loghin F. Advantages of Hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals. *Molecules*. 2021;26(15):4429.
9. Reynaud R, Scandolera A, Dinant C, Lefèvre F, Bourgon O. A new generation of oil-compatible hydrated HA. *Personal Care*. 2017; 9:61–3.
10. Goebel C, Kosemund-Meynen K, Gargano EM, Politano V, von Bölcshazy G, Zupko K, et al. Non-animal skin sensitization safety assessments for cosmetic ingredients – What is possible today? *Curr Opin Toxicol*. 2017 Aug 1; 5: 46–54.
11. Cosmetic Ingredient Review CIR [Internet]. [cited 2024 Mar 11]. Available from: <https://www.cir-safety.org/ingredients>.
12. Cosmetic Ingredient Review CIR. Available from: <https://www.cir-safety.org/ingredients>. Accessed March 11, 2024.
13. European Commission Cosmetic Ingredient Database. Cosmetic ingredient database CosIng-Glossary of ingredients (/sectors/cosmetics/cosmetic-ingredient-database/cosing-glossary-ingredients_en). Available from: https://single-market-economy.ec.europa.eu/sectors/cosmetics/cosmetic-ingredient-database_en. Accessed March 11, 2024.
14. Juncan AM, Rus LL, Morgovan C, Loghin F. Evaluation of the Safety of Cosmetic Ingredients and Their Skin Compatibility Through In Silico and In Vivo Assessments of a Newly Developed Eye Serum. *Toxics*. 2024 22; 12(7): 451.
15. Juncan AM, Morgovan C, Rus LL, Loghin F. Development and Evaluation of a Novel Anti-Ageing Cream Based on Hyaluronic Acid and Other Innovative Cosmetic Actives. *Polymers (Basel)*. 2023;15(20):4134.
16. Rizzi V, Gubitosa J, Fini P, Cosma P. Neurocosmetics in skincare—the fascinating world of skin-brain connection: A review to explore ingredients, commercial products for skin aging, and cosmetic regulation. *Cosmetics*. 2021; 8(3): 66.
17. Cosmetics Europe. Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products. Available from: https://www.cosmeticseurope.eu/files/5914/6407/8121/Guidelines_on_Stability_Testing_of_Cosmetics_CE-CTFA_-_2004.pdf. Accessed March 17, 2024.
18. Juncan AM. Packaging Evaluation and Safety Assessment of a Cosmetic Product. *Mater Plast*. 2018; 55: 644–7.
19. Juncan AM, Rus LL. Influence of Packaging and Stability Test Assessment of an Anti-Aging Cosmetic Cream. *Mater Plast*. 2018; 55: 426–30.
20. Montenegro L, Rapisarda L, Ministeri C, Puglisi G. Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E. *Cosmetics*. 2015;2(1): 35–47.
21. Olejnik A, Kapuscinska A, Schroeder G, Nowak I. Physico-chemical characterization of formulations containing endomorphin-2 derivatives. *Amino Acids*. 2017; 49(10): 1719–31.
22. Bashir A, Lambert P. Microbiological study of used cosmetic products: highlighting possible impact on consumer health. *J Appl Microbiol*. 2020; 128(2): 598–605.
23. Siegert W. Comparison of microbial challenge testing methods for cosmetics. *H&PC Today*. 2013; 8(2): 32–9.
24. Renner G, Audebert F, Burfeindt J, Calvet B, Caratas-Perifan M, Leal ME, et al. Cosmetics Europe guidelines on the management of undesirable effects and reporting of serious undesirable effects from cosmetics in the European Union. *Cosmetics*. 2017 Mar 1;4(1).
25. Gellatly N, Sewell F. Regulatory acceptance of in silico approaches for the safety assessment of cosmetic-related substances. *Computational Toxicology*. 2019; 11: 82–9.
26. Selvestrel G, Robino F, Baderna D, Manganelli S, Asturiol D, Manganaro A, et al. SpheraCosmolife: A New Tool for the Risk Assessment of Cosmetic Products. *ALTEX*. 2021;38(4):565–79.
27. COSMETICS EUROPE. Guidelines for the Assessment of Skin Tolerance of Potentially Irritant Cosmetic Ingredients. 1997.

- Available online:
https://cosmeticseurope.eu/files/2314/6407/8977/Guidelines_for_Assessment_of_Skin_Tolerance_of_Potentially_Irritant_Cosmetic_Ingredients_-_1997.pdf. Accessed March 25, 2024.
28. Goossens AE. Semi-open (or Semi-occlusive) Tests. In: Lachapelle JM, Bruze M, Elsner PU, editors. Patch Testing Tips. Berlin Heidelberg: Springer; 2014. p. 123–7.
 29. Lazzarini R, Duarte I, Ferreira AL. Patch tests. *An Bras Dermatol*. 2013 Nov;88(6):879–88.
 30. COSMETICS EUROPE. Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility. 1997. Available online: https://www.cosmeticseurope.eu/files/6014/6407/8875/Product_Test_Guidelines_for_the_Assessment_of_Human_Skin_Compatibility_-_1997.pdf. Accessed March 25, 2024.
 31. Walker AP, Basketter DA, Baverel M, Diembeck W, Matthies W, Mougin D, et al. Regulatory Test Guidelines for Assessment of Skin Compatibility of Cosmetic Finished Products in Man. *Food and Chemical Toxicology*. 1996; 34(7): 651–60.
 32. Ennen J, Degwert J, Duttiné M, Gerlach N, Jassoy C, Jünger M, et al. Studies on the Skin Compatibility of Cosmetics Involving Human Subjects—Study Portfolio and Test Strategy. *IFSCC Magazine*. 2014;17(1):19–23.
 33. COLIPA. COSMETICS EUROPE: Guidelines for the evaluation of the efficacy of cosmetics products. Available from: https://www.cosmeticseurope.eu/files/4214/6407/6830/Guidelines_for_the_Evaluation_of_the_Efficacy_of_Cosmetic_Products_-_2008.pdf. Accessed April 25, 2024.
 34. Callaghan T. Cosmetics claims and the consumer. *Personal Care*. 2019; 11: 11–13.
 35. Roso A, Aubert A, Cambos S, Vial F, Schäfer J, Belin M, et al. Contribution of cosmetic ingredients and skin care textures to emotions. *Int J Cosmet Sci*. 2024; 46(2): 262–283.
 36. Commission Recommendation of 22 September 2006 on the Efficacy of Sunscreen Products and the Claims Made Relating Thereto. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006H0647&from=EN>. Accessed 30 April, 2024.
 37. COSMETICS EUROPE. International Sun Protection Factor (Spf) Test Method. 2006. Available online: https://downloads.regulations.gov/FDA-1978-N-0018-0698/attachment_65.pdf. Accessed 30 April, 2024.
 38. de Melo MO, Maia Campos PMBG. Application of biophysical and skin imaging techniques to evaluate the film-forming effect of cosmetic formulations. *Int J Cosmet Sci*. 2019; 41(6): 579–84.
 39. Rogers V. EEMCO Guidance for the Assessment of Transepidermal Water Loss in Cosmetic Sciences Introduction: Skin Barrier and Transepidermal Water Loss. *Review Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14(2): 117–128.
 40. Monteiro Rodrigues L, Fluhr JW. EEMCO Guidance for the in vivo Assessment of Biomechanical Properties of the Human Skin and Its Annexes: Revisiting Instrumentation and Test Modes. *Skin Pharmacol Physiol*. 2020; 33(1): 44–60.
 41. Roh SS, Choi I, Kim HM, Lee MS, Jin MH, Kim BH, et al. Clinical efficacy of herbal extract cream on the skin hydration, elasticity, thickness, and dermis density for aged skin: A randomized controlled double-blind study. *J Cosmet Dermatol*. 2019; 18(5): 1389–1394.
 42. Barel AO, Courage W, Clarys Peter. Suction Chamber Method for Measurement of Skin Mechanics: The New Digital Version of the Cutometer. In: Serup J, Jemec G, editors. *Non-invasive Methods and the Skin*. 2nd Ed. CRS Press; 2006; 583–591.
 43. Leveque JL. EEMCO guidance for the assessment of skin topography. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 1999;12(2): 103–114.
 44. Houser T, Zerweck C, Grove G, Wickett R. Shadow analysis via the C+K Visioline: A technical note. *Skin Research and Technology*. 2017;23(4): 447–451.
 45. Berardesca E, Farinelli N, Rabbiosi G, Maibach HI. Skin Bioengineering in the Noninvasive Assessment of Cutaneous Aging. *Dermatology*. 1991;182(1): 1–6.

PhD THESIS SUMMARY

Skin tolerance of anti-ageing
cosmetic formulations
containing innovative active
ingredients

PhD Student **Anca-Maria Juncan**

PhD Supervisor Prof.dr. **Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 13 |
| CURRENT STATE OF KNOWLEDGE | 13 |
| PERSONAL CONTRIBUTION | 13 |
| 1. Hypothesis/objectives of the thesis | 13 |
| 2. Study 1. Development of the anti-ageing cosmetic formulations | 14 |
| 2.1. Introduction | 14 |
| 2.2. Hypothesis and objectives | 14 |
| 2.3. Materials and methods | 14 |
| 2.4. Results and discussions | 14 |
| 2.5. Conclusions | 15 |
| 3. Study 2. Quality control of the developed cosmetic formulations – Stability testing, physicochemical and microbiological evaluation | 15 |
| 3.1. Introduction | 15 |
| 3.2. Hypothesis and objectives | 15 |
| 3.3. Materials and methods | 15 |
| 3.4. Results and discussions | 15 |
| 3.5. Conclusions | 15 |
| 4. Study 3. Evaluation of the safety and skin tolerance through <i>in silico</i> and <i>in vivo</i> assessments of the developed anti-ageing formulatons | 15 |
| 4.1. Introduction | 15 |
| 4.2. Hypothesis and objectives | 16 |
| 4.3. Materials and methods | 16 |
| 4.4. Results and discussions | 16 |
| 4.5. Conclusions | 17 |
| 5. Study 4. Efficacy assessment of the developed anti-ageing formulations | 17 |
| 5.1. Introduction | 17 |
| 5.2. Hypothesis and objectives | 17 |
| 5.3. Materials and methods | 17 |
| 5.4. Results and discussions | 17 |
| 5.5. Conclusions | 18 |
| 6. General conclusions | 18 |
| 7. The originality and innovative contributions of the thesis | 18 |
| SELECTED REFERENCES | 19 |

Keywords: anti-ageing formulations, active cosmetic ingredients, hyaluronic acid, safety assessment, *in silico* evaluation, skin tolerance, efficacy assessment

INTRODUCTION

The increasing share of the global elderly population, along with technological advances in the cosmetic industry, are key factors driving the growth of the anti-ageing products market. Anti-wrinkle products are gaining importance through innovative formulations to slow down the ageing process.

The legislative framework, namely Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of November 30, 2009 on cosmetic products, highlights the importance of the safety assessment of cosmetics and the general aspects that guarantee their quality, efficacy and safety (1).

The variety, considering the chemical structure and the mechanism of action of recently developed and commercially available ingredients with regenerating, moisturizing or anti-ageing properties, leads to a diversity of cosmetic formulations that require skin tolerance and compatibility evaluation, together with efficacy assessment (2).

The main objective of the study was to develop complementary cosmetic formulations, specifically designed for mature skin and to alleviate the effects of skin ageing. The developed formulations contain different molecular weight hyaluronic acid (HA), in combination with and other active ingredients, in this unique combination providing optimal skin moisturization, and the products are considered to be innovative and specifically designed to reduce the visible signs of skin aging.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Skin ageing is a multifaceted phenomenon that takes place gradually over a period of several decades. In addition to endogenous factors, different environmental influences sustain the skin ageing process. Skin functionality declines, resulting in the appearance of various conditions and diverse skin diseases, which can seriously diminish the quality of life. Acknowledging the pathophysiology of skin ageing and taking precautionary measures to prevent skin damage represents the initial step towards achieving a healthy ageing process (3). Optimal health includes improving the appearance of aged skin, with the possibility to use not only safer and more effective active ingredients but also cosmetic products and procedures to diminish non-aesthetically appealing skin appearance (4).

Current trends in cosmetology are based on formulations and products that utilize the human body's own substances. HA, which possesses the ability to bind water up to 1000 times its volume, has a relevant contribution to cellular growth, adhesion, and membrane receptor function. The major biologic role of HA in the intercellular matrix is to reinforce the intercellular structures and to produce the elastoviscous fluid matrix that firmly envelops collagen and elastin fibers. HA holds moisture and provides firmness and radiance to the skin as well (5).

Considering that hyaluronic acid has recently a wide use and a multitude of biomedical applications, the evaluation of the main aspects related to its applications in cosmetology is of significant interest, based on the biological effect of HA at skin level and its potential adverse effects.

Some commercially available cosmetics incorporating HA in their formulations claim to moisturize and restore skin elasticity; these biophysical parameters are closely related to the anti-ageing effect, but no rigorous scientific evidence fully substantiates this claim. Biological activity and HA penetration into the skin depends on the molecular weight of this substance showing different effects on the skin. The main action of the HMW-HA polymer is film forming and it reduces evaporation of water from the skin and thus possesses an occlusive effect. MMW-HA and LMW-HA hygroscopic properties justify the ability to maintain skin hydration (6,7). HA and its sodium and potassium salts are important cosmetic ingredients that are incorporated in moisturizing and anti-ageing products. Additionally, products that contain HA represent only 5%, while more than 95% of the total products contain sodium hyaluronate (NaHA) (8,9).

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Hypothesis/objectives of the thesis

The use of innovative active ingredients and the diversity of cosmetic products that support an anti-ageing effect is ample proof that the cosmetic industry is currently relying on this ingredient category (8).

The main objective of the research was to develop complementary cosmetic formulations, incorporating different molecular weight HA, microencapsulated NaHA, and other innovative active ingredients, for the cosmetic treatment of mature skin, and also to assess the safety, in terms of skin tolerance and compatibility, as well the efficacy of the formulations.

The cosmetic claim of the formulations is based on a combination of innovative active ingredients - low

molecular weight hyaluronic acid (LMW-HA) or medium molecular weight hyaluronic acid (MMW-HA), microencapsulated NaHA, ectoin, gold or vitamin A and E microcapsules, and an anti-ageing botanical complex, which contribute to an optimal skin moisturization, specifically designed to reduce the visible signs of skin ageing, especially in the periorbital area.

In order to demonstrate the quality of the developed cosmetic formulations, accelerated stability tests, microbiological control, including efficacy testing of the used preservative (Challanage tests), and physico-chemical characteristics were evaluated.

Another objective of this study was to present a screening model for the safety evaluation of the cosmetic formulations by identifying individual ingredients. *In silico* approaches were applied to demonstrate the safety of cosmetic-related substances and the risk assessment of the cosmetic formulations. Safety and instrumental evaluation were performed to demonstrate the skin tolerance—the compatibility and the efficacy, respectively—of the developed anti-ageing formulations.

Even if New Approach Methodologies (NAM) are currently widely used for the risk assessment of cosmetic ingredients and formulations, there is still a high demand for a combined risk evaluation methodology, as alternative tests are not always fully applicable for multicomponent ingredients and cosmetic formulations, this representing a main disadvantage compared, e.g., to *in vivo* evaluation.

2. Study 1. Development of the anti-ageing cosmetic formulations

2.1. Introduction

Cosmetic formulations contain a mixture of different ingredients with various properties, like emollients, preservatives, humectants, surfactants, fragrances, colorants, and sometimes vegetal extracts. Although generally safe for consumers, a sub-population may experience allergic reactions (10). The safety of cosmetic formulations represents an essential and mandatory legislative requirement and a major industry priority.

2.2. Hypothesis and objectives

Safety information on cosmetic ingredients is published in various databases such as CosIng (Cosmetic Ingredient database) and Cosmetic Ingredient Review (CIR) and together with data obtained from the Material Safety Data Sheet (MSDS) it represents important sources for the selection of ingredients in cosmetic formulations.

2.3. Materials and methods

In accordance with the material safety data sheets (MSDS), a prioritization and classification of the studied cosmetic ingredients was carried out to provide a solid basis for the selection of raw materials for the product base that was formulated—emulsifiers, emollients, viscosity modifiers, pH modifiers, preservatives, etc. The formulations were generically denominated “Anti-ageing cream”, “Anti-ageing cleansing emulsion”, “Anti-ageing eye serum”, respectively “Regenerating cream”.

For the selection of the active ingredients, the documentation and related efficacy studies were reviewed. LMW- and MMW-HA, microencapsulated NaHA, 22 k gold microcapsules, ectoin, and a pigment with mattifying and anti-ageing effects in the Anti-ageing cream and Vitamin A and E microcapsules in the Regenerating cream, were selected as active ingredients. Additionally, a botanical active derived from horse chestnut flowers—fructose, glycerine, water, and *Aesculus Hippocastanum* (horse chestnut) extract—was incorporated into the cosmetic formulations. It possesses anti-ageing effects, especially smoothing the eye contour area and acting on periorbital wrinkles. Also, three formulations (Anti-ageing cream, Anti-ageing cleansing emulsion and the Regenerating cream) contain a complex of three functionalized waxes based on jojoba, mimosa, and sunflower wax (INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) *Jojoba* esters and *Acacia Decurrens* flower wax and *Helianthus Annuus* (sunflower) seed wax and polyglycerin-3, which acts as an emollient, bringing softness to the skin.

Available information on the safe use level and ingredient concentration was retrieved from the CosIng, CIR and COSMILE Europe, independent entities responsible for the safety evaluation of individual cosmetic ingredients (11–13).

Based on the selected ingredients and depending on the cosmetic formulation category, four cosmeceutical formulations were developed (14,15).

2.4. Results and discussions

In this study, innovative ingredients were selected with the aim of developing complementary cosmetic formulations to improve skin ageing.

The selection of active ingredients was based on the cosmetic claim of the developed formulations. Thus, LMW-HA, MMW-HA and encapsulated NaHA were incorporated, together with other active ingredients, which can sustain complementary beneficial effects—a botanical complex, ectoin, a 22 k gold and Vitamin A and E microcapsules,

depending on the developed formulation category.

LMW-HA stimulates tight junction protein synthesis, increasing moisturization, and sustains collagen type I synthesis, providing skin firmness. MMW-HA increases fibroblasts and keratinocytes' proliferation, sustaining the skin cellular regeneration process. The extract based on *Aesculus hippocastanum* rich in flavonoids provides periorbital-wrinkle-reducing properties, claiming an anti-ageing effect by sustaining the dermo-epidermal junction integrity, increasing the synthesis of type IV and VII collagen, and holding a smoothing capacity.

2.5. Conclusions

In this study, emollient, emulsifier, viscosity modifier, preservative and innovative active ingredients were selected considering their compatibility, but also the stability of the developed cosmetic formulations. The used databases review relevant data regarding the safety profiles of the selected cosmetic ingredients. The selection of active ingredients was based on the claim of the developed formulations

The developed cosmetic formulations could serve as a daily care for mature skin to alleviate the effects of skin ageing.

3. Study 2. Quality control of the developed cosmetic formulations – Stability testing, physicochemical and microbiological evaluation

3.1. Introduction

The quality of a cosmetic preparation is related to the provision of specifications with the expected compliance, such as aspect, color and odor, physicochemical properties, stability, control of contaminants (for, e.g., pathogenic micro-organisms), etc. (16).

3.2. Hypothesis and objectives

To assess the quality of the developed cosmetic formulations, stability testing, physicochemical characteristics, and microbiological control, including efficacy testing of the used preservative (Challenge test) were performed.

3.3. Materials and methods

In accordance with the current legislation, namely Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products a series of tests was carried out: (I) stability testing of the cosmetic formulations; (II) physicochemical control, organoleptic testing (appearance, colour, odour), and determination of the pH, density and viscosity of the developed formulations; (III) microbiological evaluation for the assessment of microbiological contamination and preservative efficacy test (Challenge test) (14,15,22,23).

3.4. Results and discussions

Considering the quality characteristics, several evaluations were conducted, in order to demonstrate the physicochemical and pharmacotechnical properties of the developed anti-ageing formulations. The results demonstrated the stability of the developed formulations under the performed study and conditions, and they showed that they possess adequate physicochemical properties.

The microbiological quality of the developed anti-ageing formulations was confirmed and, the performed challenge test evidenced the effectiveness of the antimicrobial protection of the developed cosmetic formulations

3.5. Conclusions

In the performed study, stability tests were conducted by exposing samples of the developed cosmetic formulations under accelerated temperature conditions, followed by the evaluations of various parameters to observe any physical, chemical, or microbiological changes. The results confirmed, according to stability testing and physicochemical characteristics, acceptable cosmetic preparations with optimal appearance and appropriate physicochemical characteristics. Microbiological control, including efficacy testing of the used preservative were also confirmed for the developed formulations.

4. Study 3. Evaluation of the safety and skin tolerance through *in silico* and *in vivo* assessments of the developed anti-ageing formulations

4.1. Introduction

The term "risk assessment" is often substituted with "safety assessment", to demonstrate the safe properties of cosmetic ingredients and formulations (1,24). The cosmetics industry is highly motivated to apply non-animal approaches, also known as new approach methodologies (NAMs) or next-generation risk assessment (NGRA), including *in vitro*, *in chemico*, and *in silico* evaluations. These refer to toxicological endpoints and can be applied according to the Cosmetics Regulation No. 1223/2009, which prohibits animal testing, as well as to marketing of cosmetic ingredients and finished products (25).

4.2. Hypothesis and objectives

In silico data are useful in regulatory risk assessment when used as supporting evidence in an overall safety evaluation of cosmetic formulations. An appropriate use of *in silico* models can provide a useful non-animal alternative for the estimation of toxicity of cosmetic ingredients. The *in silico* models need to be integrated with other lines of evidence (e.g. *in vitro* and/or *in vivo* data) in the form of an overall safety evaluation for use in safety assessment of a cosmetic ingredient/formulation.

The objective of this study was to present a complex screening model for the safety evaluation of the developed cosmetic formulations by identifying individual ingredients, and to confirm the skin compatibility/tolerance based on *in vivo* assessment.

4.3. Materials and methods

A new software for integrated hazard and exposure assessment for risk assessment of cosmetic ingredients (SpheraCosmolife v. 0.24), a system dedicated to the specific field of cosmetics, was used for *in silico* evaluation of the formulation's cosmetic ingredients. The used software calculates external dermal exposure and internal exposure (systemic exposure dose) via modelling Kp (skin permeability coefficient), providing hazard identification for different toxicological endpoints. The system searches experimental values for NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), provides model predicted values, calculating the margin of safety (MoS) and the threshold of toxicological concern (TTC) using a Cramer decision tree (14,15,26).

The aim of the dermatological Semi-open test was the assessment of the sensitizing/irritant potential and the skin tolerance of the developed formulations on healthy human skin under a patch test, evaluating the erythema and skin oedema level after product application (on the arm or interscapular area) – 48 h, respectively 72 h after product application (27–29).

Considering the in use test with dermatological control, the evaluation focused on the assessment of the developed cosmetic formulations tolerance at the application site based on regular, repetitive application of the product (repetitive test for 28 days) (30–32).

4.4. Results and discussions

For the safety assessment, the results provided by the used software are dependent on the declared functions of the ingredient, its application, the concentration in different cosmetic product categories and the frequency of use. Based on this aspects, hazard and exposure specifications of the cosmetic ingredients incorporated in the developed formulations were presented. Also, data on the following information were included: (i) the presence of an ingredient in an Annex of the Cosmetics Regulation, (ii) mutagenicity (Ames test), (iii) skin sensitization, (iv) the dermal absorption (according to the Kroes approach), (v) the MoS, and (vi) the TTC.

To demonstrate the safety of the ingredients of the developed formulations, a risk characterization was performed given the systemic toxicity and the MoS. The software also featured an evaluation utilizing the TTC approach (according to Cramer class classification and adapted for cosmetic ingredients, calculated by SpheraCosmolife: Class I – low toxicity (0,046 mg/kgbw/day) and Class II – medium toxicity (0,023 mg/kgbw/day), in which the external and internal exposure data are compared with the TTC threshold for the specific ingredient considering the dermal bioavailability of cosmetics.

The concentrations of restricted ingredients used in the developed formulations, like preservatives and UV filters were in accordance with those recommended by the Regulation (EC) No. 1223/2009 and so were considered to be safe. The SpheraCosmolife software provided valuable data for mutagenicity and skin sensitization hazard identification and characterization, especially for hydrolyzed HA (LMW- and MMW-HA) at a concentration of 0.7% in a cosmetic formulation specifically recommended for the periorbital area (Anti-ageing eye serum), evidencing low skin sensitization.

The performed *in vivo* safety evaluation permits to conclude that the developed anti-ageing formulations used by the subjects did not cause any hypersensitivity. In the test panel of subjects, irritations or allergic reactions were not observed, leading to the conclusion that the cosmetic formulations meet the criteria of skin compatibility. The cosmetic formulations were classified as “not irritating” according to $X_{av} < 0,50$ (Average irritation index (X_{av}) expressed as skin response of subjects for the evaluation of irritating and sensitizing effects) and were well tolerated by the skin.

Based on the examinations and interviews collected from subjects included in the in use test with dermatological control, it was demonstrated that the tested formulations were very well tolerated at the application site. In all subjects who finished the study (subject No. 2 finished the study at day 24 instead of day 28, and subject No. 6 did not finish the study for the Anti-ageing cream; subject No. 2 and 9 did not finish the study for the Anti-ageing eye

serum) during the regular application, there were no negative symptoms that evidenced any intolerance to any ingredient of the tested formulations, such as irritation, burning sensation, redness, or itching.

4.5. Conclusions

Based on the complexity of the described data, a screening safety evaluation method was performed by identifying individual ingredients by *in silico* models, together with skin compatibility confirmation through *in vivo* assessment.

The used software provided valuable data regarding skin sensitization, especially for hydrolyzed HA, which in the proposed concentration of 0.7% and incorporated in a cosmetic product formulated for the periorbital area (Anti-ageing eye serum), showed low sensitizing properties. Concentrations of restricted ingredients—phenoxyethanol as a preservative and butylmethoxydibenzoylmethane as a UVA filter—incorporated in the formulation were in accordance with those recommended by the Regulation (EC) No. 1223/2009 and so were considered and confirmed to be safe.

In vivo evaluation proved the skin compatibility through a lack of a sensitizing/irritant effect under patch test for the developed cosmetic formulations. The clinical safety assessment performed for the cosmetic formulations allow to conclude that the anti-ageing formulations respect the requirements of the skin compatibility evaluation, so they can be classified as “not irritating” and are very well tolerated at the application site.

5. Study 4. Efficacy assessment of the developed anti-ageing formulations

5.1. Introduction

The efficacy of cosmetics refers to the capacity of providing the claimed effect. The desired properties of a cosmetic formulation can be achieved by using appropriate active ingredients claiming the efficacy of the product together with the adequate excipients (33–35).

5.2. Hypothesis and objectives

Claims on cosmetic formulations have to comply with the definition of cosmetics according to Regulation No. 1223/2009 and must meet certain criteria regarding their truthfulness and fairness in line with the current legislative issues. The claimed effects considering the efficacy of cosmetic products must be supported by scientific evidence (Art. 11 and Art. 20 of Regulation No. 1223/2009).

An important objective was represented by the efficacy assessment of the developed cosmetic formulations by instrumental evaluation.

5.3. Materials and methods

Considering the Anti-ageing cream, the aim of the efficacy evaluation was the assessment of the cosmetic formulations effect on the reduction of wrinkle length and depth (Visioline® VL 650, Courage + Khazaka, Köln, Germany) (15).

The sun protection factor (SPF) assessment represented the evaluation of the protection provided by the developed cosmetic formulation against erythema (reddening of the skin) caused by solar ultraviolet rays on human skin, utilizing a simulator with a xenon arc lamp of specific and defined output (Solar Light type Single Port 16S-150-001, Solar Light Co. Erythema DCS detector PMA2105, Solar Light Co., Glenside, PA, USA) (15,36,37).

Transepidermal Water Loss (TEWL), respectively skin barrier function were evaluated for the Regenerating cream by tewametry (Tewameter® TM 300, Courage + Khazaka, Köln, Germania) (38,39).

Skin elasticity and firmness were evaluated by cutometry (Cutometer® MPA 580, Courage + Khazaka, Köln, Germania) for the Anti-aging cleansing emulsion (33,40–42).

Wrinkle depth and length in the periorbital area were evaluated considering skin microrelief assessment (Visioline® VL 650, Courage + Khazaka, Köln, Germania) for the Anti-ageing eye serum (43–45).

Self-assessment studies were carried out based on questionnaires regarding subjects' appreciation of the cosmetic quality and efficacy of the tested formulations. (15).

5.4. Results and discussions

Through skin microrelief analysis, it was demonstrated that the Anti-ageing cream reduces wrinkle length (67% subjects with positive response, $\Delta = -8\%$) and depth (78% subjects with positive response, $\Delta = -6\%$) when the parameters value decrease. SPF determination showed that the average SPF value is 16.0, demonstrating that the SPF value that can be claimed on the cosmetic formulation (according to 2006/647/EC) is 15 (average protection).

Following instrumental evaluation by tewametry, it was demonstrated that the Regenerating cream has a regenerating effect and it reinforces the hydro-lipid skin barrier.

Considering the instrumental assessment by cutometry, namely by evaluation of the parameters R2 (skin

elasticity) and R0 (skin firmness), it was demonstrated that the Anti-ageing cleansing emulsion improves skin elasticity and firmness.

Also, through skin microrelief analysis, it was demonstrated that the Anti-ageing eye serum reduces wrinkle length (57% subjects with positive response, $\Delta = -1\%$) and depth (100% subjects with positive response, $\Delta = -6\%$) when the parameters value decrease.

5.5. Conclusions

Under the studies conditions, the claimed effects of the developed formulations were monitored by using bioinstrumental techniques, evaluating the biophysical parameters that characterize the skin (elasticity and firmness, transepidermal water loss) and by skin microrelief analysis, but also by determining the SPF for the Anti-ageing cream.

6. General conclusions

Nowadays, HA is one of the most widely used active ingredients in cosmetic formulations. The efficacy of hyaluronic acid depends largely on the molecular weight, claiming different effects like hydrating, regenerating, and anti-ageing. HA or hyaluronates are used in combination with other active ingredients, like botanical extracts, vitamins, probiotics, amino acids, peptides, proteins, etc. These compounds improve the cosmetic formulation qualities and benefits, awarding additional claims.

Through the performed studies, four complementary cosmetic formulations were developed, which could provide an optimal basis for healthy skin ageing and serve as a skin regimen that would be able to block or reverse negative epigenetic changes, together with their safety and efficacy evaluation.

Considering the quality characteristics, the results confirmed, according to stability testing and physicochemical characteristics, acceptable cosmetic preparations with optimal appearance and appropriate physicochemical characteristics. Microbiological control, including efficacy testing of the used preservative (challenge test) were also confirmed for the developed formulations.

Risk assessment was performed for the safety evaluation of cosmetic ingredients with the aid of *in silico* approaches. The concentrations of restricted ingredients used in the developed formulations, like preservatives and UV filters in a cosmetic formulation which claims medium SPF, were in accordance with those recommended by the Regulation (EC) No. 1223/2009 and so were considered to be safe. The used software provided valuable data, especially for mutagenicity and skin sensitization.

Skin tolerance and the absence of sensitizing potential of the developed cosmetic formulations under patch test and under normal conditions of product use were confirmed by *in vivo* evaluation.

The claimed effects of the developed formulations were monitored by using bioinstrumental techniques, evaluating the biophysical parameters that characterize the skin (elasticity and firmness, transepidermal water loss) and by skin microrelief analysis. According to the SPF evaluation for the Anti-ageing cream, a SPF value of 15 (medium protection) was confirmed.

The complementary developed anti-ageing formulations, innovative considering their ingredients combination, could represent a continuous cosmetic treatment of mature skin.

7. The originality and innovative contributions of the thesis

The originality of the thesis relies primarily on the development of complementary cosmetic formulations for the cosmetic treatment of mature skin, incorporating different molecular weight hyaluronic acid or microencapsulated sodium hyaluronate, in a unique combination with other active ingredients.

Through the research, a complex and innovative combined evaluation methodology was applied to demonstrate the safety of cosmetic-related substances and the risk assessment of the developed cosmetic formulations based on alternative *in silico* methods, together with skin compatibility confirmation through *in vivo* evaluation.

A correct and conclusive evaluation methodology considering safety and efficacy assessment of cosmetic formulations, while ensuring strict quality standards in accordance with the legal aspects, also represented a novel and complex approach.

Considering the research results and the scientific impact, studies have been published in journals with international impact and ISI indexed (quartiles Q1 and Q2). For one cosmetic formulation developed during the research, a patent registered at the State Office for Inventions and Trademarks (OSIM) was obtained (Cellular Regenerating Cream. State Office for Inventions and Trademarks Romania; 134810 A2/2021).

SELECTED REFERENCES

1. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32009R1223>. Accessed January 24, 2024.
2. Farage MA, Miller KW, Maibach HI. Textbook of Aging Skin. In: Textbook of Aging Skin. 2014; 1–18.
3. Elsner P, Fluhr JW, Gehring W, Kerscher MJ, Krutmann J, Lademann J, et al. Anti-aging data and support claims--consensus statement. *JDDG*. 2011;9; Suppl 3: S1–32.
4. Ayer J, Griffiths CEM. Photoaging in Caucasians. In: Rhodes L, Sage E, Trotta M, editors. *Cutaneous Photoaging*. London: The Royal Society of Chemistry; 2019. 1-30.
5. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L, Coto G. Hyaluronic Acid and Wound Healing. *J Pharm Pharm Sci*. 2015;18(1):53–60.
6. Mondon P, Doridot E, Ringenbach C, Gracioso O. Hyaluronic acid: history and future potential. *Personal Care*. 2015; 6:27–30.
7. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers (Basel)*. 2018 Jun 25;10(7):701–737.
8. Juncan AM, Moisă DG, Santini A, Morgovan C, Rus LL, Vonica-Țincu AL, Loghin F. Advantages of Hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals. *Molecules*. 2021;26(15):4429.
9. Reynaud R, Scandolera A, Dinant C, Lefèvre F, Bourgon O. A new generation of oil- compatible hydrated HA. *Personal Care*. 2017; 9:61–3.
10. Goebel C, Kosemund-Meynen K, Gargano EM, Politano V, von Bölcshazy G, Zupko K, et al. Non-animal skin sensitization safety assessments for cosmetic ingredients – What is possible today? *Curr Opin Toxicol*. 2017 Aug 1; 5: 46–54.
11. Cosmetic Ingredient Review CIR [Internet]. [cited 2024 Mar 11]. Available from: <https://www.cir-safety.org/ingredients>.
12. Cosmetic Ingredient Review CIR. Available from: <https://www.cir-safety.org/ingredients>. Accessed March 11, 2024.
13. European Commission Cosmetic Ingredient Database. Cosmetic ingredient database CosIng-Glossary of ingredients (/sectors/cosmetics/cosmetic-ingredient-database/cosing-glossary-ingredients_en). Available from: https://single-market-economy.ec.europa.eu/sectors/cosmetics/cosmetic-ingredient-database_en. Accessed March 11, 2024.
14. Juncan AM, Rus LL, Morgovan C, Loghin F. Evaluation of the Safety of Cosmetic Ingredients and Their Skin Compatibility Through In Silico and In Vivo Assessments of a Newly Developed Eye Serum. *Toxics*. 2024 22; 12(7): 451.
15. Juncan AM, Morgovan C, Rus LL, Loghin F. Development and Evaluation of a Novel Anti-Ageing Cream Based on Hyaluronic Acid and Other Innovative Cosmetic Actives. *Polymers (Basel)*. 2023;15(20):4134.
16. Rizzi V, Gubitosa J, Fini P, Cosma P. Neurocosmetics in skincare—the fascinating world of skin-brain connection: A review to explore ingredients, commercial products for skin aging, and cosmetic regulation. *Cosmetics*. 2021; 8(3): 66.
17. Cosmetics Europe. Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products. Available from: https://www.cosmeticseurope.eu/files/5914/6407/8121/Guidelines_on_Stability_Testing_of_Cosmetics_CE-CTFA_-_2004.pdf. Accessed March 17, 2024.
18. Juncan AM. Packaging Evaluation and Safety Assessment of a Cosmetic Product. *Mater Plast*. 2018; 55: 644–7.
19. Juncan AM, Rus LL. Influence of Packaging and Stability Test Assessment of an Anti-Aging Cosmetic Cream. *Mater Plast*. 2018; 55: 426–30.
20. Montenegro L, Rapisarda L, Ministeri C, Puglisi G. Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E. *Cosmetics*. 2015;2(1): 35–47.
21. Olejnik A, Kapuscinska A, Schroeder G, Nowak I. Physico-chemical characterization of formulations containing endomorphin-2 derivatives. *Amino Acids*. 2017; 49(10): 1719–31.
22. Bashir A, Lambert P. Microbiological study of used cosmetic products: highlighting possible impact on consumer health. *J Appl Microbiol*. 2020; 128(2): 598–605.
23. Siegert W. Comparison of microbial challenge testing methods for cosmetics. *H&PC Today*. 2013; 8(2): 32–9.
24. Renner G, Audebert F, Burfeindt J, Calvet B, Caratas-Perifan M, Leal ME, et al. Cosmetics Europe guidelines on the management of undesirable effects and reporting of serious undesirable effects from cosmetics in the European Union. *Cosmetics*. 2017 Mar 1;4(1).
25. Gellatly N, Sewell F. Regulatory acceptance of in silico approaches for the safety assessment of cosmetic-related substances. *Computational Toxicology*. 2019; 11: 82–9.
26. Selvestrel G, Robino F, Baderna D, Manganelli S, Asturiol D, Manganaro A, et al. SpheraCosmolife: A New Tool for the Risk Assessment of Cosmetic Products. *ALTEX*. 2021;38(4):565–79.
27. COSMETICS EUROPE. Guidelines for the Assessment of Skin Tolerance of Potentially Irritant Cosmetic Ingredients. 1997. Available online: https://cosmeticseurope.eu/files/2314/6407/8977/Guidelines_for_Assessment_of_Skin_Tolerance_of_Potentially_Irritant_Cosmetic_Ingredients_-_1997.pdf. Accessed March 25, 2024.
28. Goossens AE. Semi-open (or Semi-occlusive) Tests. In: Lachapelle JM, Bruze M, Elsner PU, editors. *Patch Testing Tips*. Berlin Heidelberg: Springer; 2014. p. 123–7.

29. Lazzarini R, Duarte I, Ferreira AL. Patch tests. *An Bras Dermatol*. 2013 Nov;88(6):879–88.
30. COSMETICS EUROPE. Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility. 1997. Available online: https://www.cosmeticseurope.eu/files/6014/6407/8875/Product_Test_Guidelines_for_the_Assessment_of_Human_Skin_Compatibility_-_1997.pdf. Accessed March 25, 2024.
31. Walker AP, Basketter DA, Baverel M, Diembeck W, Matthies W, Mougin D, et al. Regulatory Test Guidelines for Assessment of Skin Compatibility of Cosmetic Finished Products in Man. *Food and Chemical Toxicology*. 1996; 34(7): 651–60.
32. Ennen J, Degwert J, Duttiné M, Gerlach N, Jassoy C, Jünger M, et al. Studies on the Skin Compatibility of Cosmetics Involving Human Subjects-Study Portfolio and Test Strategy. *IFSCC Magazine*. 2014;17(1):19–23.
33. COLIPA. COSMETICS EUROPE: Guidelines for the evaluation of the efficacy of cosmetics products. Available from: https://www.cosmeticseurope.eu/files/4214/6407/6830/Guidelines_for_the_Evaluation_of_the_Efficacy_of_Cosmetic_Products_-_2008.pdf. Accessed April 25, 2024.
34. Callaghan T. Cosmetics claims and the consumer. *Personal Care*. 2019; 11: 11–13.
35. Roso A, Aubert A, Cambos S, Vial F, Schäfer J, Belin M, et al. Contribution of cosmetic ingredients and skin care textures to emotions. *Int J Cosmet Sci*. 2024; 46(2): 262–283.
36. Commission Recommendation of 22 September 2006 on the Efficacy of Sunscreen Products and the Claims Made Relating Thereto. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006H0647&from=EN>. Accessed 30 April, 2024.
37. COSMETICS EUROPE. International Sun Protection Factor (Spf) Test Method. 2006. Available online: https://downloads.regulations.gov/FDA-1978-N-0018-0698/attachment_65.pdf. Accessed 30 April, 2024.
38. de Melo MO, Maia Campos PMBG. Application of biophysical and skin imaging techniques to evaluate the film-forming effect of cosmetic formulations. *Int J Cosmet Sci*. 2019; 41(6): 579–84.
39. Rogers V. EEMCO Guidance for the Assessment of Transepidermal Water Loss in Cosmetic Sciences Introduction: Skin Barrier and Transepidermal Water Loss. *Review Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14(2): 117–128.
40. Monteiro Rodrigues L, Fluhr JW. EEMCO Guidance for the in vivo Assessment of Biomechanical Properties of the Human Skin and Its Annexes: Revisiting Instrumentation and Test Modes. *Skin Pharmacol Physiol*. 2020; 33(1): 44–60.
41. Roh SS, Choi I, Kim HM, Lee MS, Jin MH, Kim BH, et al. Clinical efficacy of herbal extract cream on the skin hydration, elasticity, thickness, and dermis density for aged skin: A randomized controlled double-blind study. *J Cosmet Dermatol*. 2019; 18(5): 1389–1394.
42. Barel AO, Courage W, Clarys Peter. Suction Chamber Method for Measurement of Skin Mechanics: The New Digital Version of the Cutometer. In: Serup J, Jemec G, editors. *Non-invasive Methods and the Skin*. 2nd Ed. CRS Press; 2006; 583–591.
43. Leveque JL. EEMCO guidance for the assessment of skin topography. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 1999;12(2): 103–114.
44. Houser T, Zerweck C, Grove G, Wickett R. Shadow analysis via the C+K Visioline: A technical note. *Skin Research and Technology*. 2017;23(4): 447–451.
45. Berardesca E, Farinelli N, Rabbiosi G, Maibach HI. Skin Bioengineering in the Noninvasive Assessment of Cutaneous Aging. *Dermatology*. 1991;182(1): 1–6.