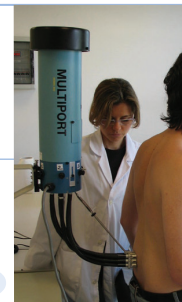


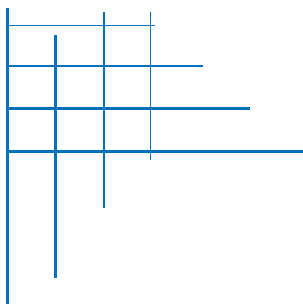
in vitro



Cosmetica: Test di efficacia e sicurezza

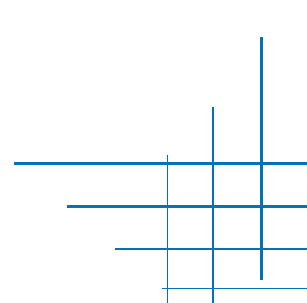


in vivo



Chelab srl
Environmental and Non food Laboratories

Via Castellana, 118/a
31023 Resana TV
Tel. +39 0423 7177
Fax +39 0423 715048
e-mail: info@chelab.com



VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA e SICUREZZA DEI PRODOTTI COSMETICI

La **valutazione funzionale delle formulazioni cosmetiche** può essere considerata come un continuum che parte dalle valutazioni strumentali del laboratorio e finisce con il test del mercato.

Chelab si è specializzata nelle valutazioni strumentali in modo tale da garantire ai propri clienti

- ❑ controllo delle condizioni ambientali
- ❑ rigore scientifico
- ❑ trasparenza
- ❑ rilevanza dimostrata

Dimostrazione di un claim

Grazie alle moderne tecniche si riescono a descrivere e a quantificare molti degli effetti attribuiti ai prodotti cosmetici permettendo la creazione di dossier di efficacia solidamente documentati. I laboratori Chelab, infatti, sono in grado di mettere a punto test in grado di soddisfare le esigenze del cliente.

Il servizio si avvale

- di personale che vanta anni di esperienza specifica nel settore merceologico ed è inserito in programmi annuali di formazione e aggiornamento che ne aumentano e aggiornano il livello di conoscenze.
- certificazione della conformità degli strumenti eseguita da un laboratorio esterno tedesco abilitato nel monitoraggio di sorgenti di radiazioni UV in accordo con Guidelines for Monitoring UV radiation Sources (COLIPA recommendation nr 22)

Viene di seguito proposto un elenco rappresentativo dei servizi offerti alle imprese:

1. Determinazione in vivo del fattore di protezione solare (SPF)
2. Valutazione *in vivo* della resistenza all'acqua di prodotti solari (secondo metodo FDA e linee guida COLIPA)
3. Determinazione *in vitro* dello spettro di assorbimento (290-400 nm), e del fattore di protezione solare (SPF).
4. Determinazione *in vitro* del fattore di protezione UVA e lunghezza d'onda critica secondo linee guida COLIPA
5. Determinazione *in vitro* della fotostabilità dei filtri UV.
6. Determinazione della fototossicità
7. Valutazione dell'idratazione cutanea – short term test
8. Perdita d'acqua per traspirazione (TEWL) - short term test
9. Valutazione dell'attività sebo-normalizzante – long term test
10. Prova di flessibilità di rossetti *in vitro*
11. Prova di resistenza allo sfregamento di rossetti dopo dry – blot
12. Prova di resistenza allo sfregamento di rossetti dopo oil – blot
13. Prova di resistenza all'acqua di mascara in vitro
14. Prova di resistenza all'acqua di eye-liner in vitro
15. Analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione SEM su ciocche di capelli naturali

16. Patch – test in singola applicazione eseguito in collaborazione con la clinica dermatologica dell’Università di Padova.
17. Valutazione del potenziale di irritazione e dell’ “*effetto reservoir*” di saponi utilizzando l’Occlusive Patch test seguito da misurazioni della TEWL.
18. Test di comedogenesi in vivo
19. Test oftalmologico eseguito in collaborazione con la clinica oculistica dell’Università di Padova.
20. Valutazione in vitro del potenziale irritativo cutaneo utilizzando il metodo Dermal Irritection
21. Valutazione in vitro del potenziale irritativo oculare utilizzando il metodo Ocular Irritection
22. Screening in vitro di pro-sensibilizzazione cutanea
23. Sniff test su deodoranti e anti-perspiranti.
24. Analisi sensoriale di prodotti cosmetici: consumer test.
25. Valutazione del PAO (Period After Opening) su prodotti cosmetici.
26. Valutazione dell’efficacia dei prodotti per combattere gli inestetismi cutanei mediante DERMATOP BLUE
27. Test di irritazione cutanea
28. Test di irritazione oculare
29. Test di sensibilizzazione cutanea
30. Test di tossicità
31. Test di mutagenesi

1. Determinazione in vivo del fattore di Protezione Solare (SPF)

Scopo del saggio: Verificare il livello di protezione solare di un prodotto cosmetico mediante i seguenti metodi in vivo

- Colipa/JCIA/CTFA-SA/CTFA-US International SPF test method
- FDA

Soggetti sottoposti all'esperimento:

- n° volontari:
 - COLIPA/JCIA/CTFA-SA/CTFA US : 10 risultati validi con max n° 20 volontari, età: 18 – 60, sesso: M/F
 - FDA: 20 risultati validi con max n° 25 volontari, età: 18 – 60, sesso: M/F
- criteri di selezione dei volontari:
 - soggetti sani aventi fototipo I, II, III
- criteri di esclusione dal test:
 - portatori di fotodermatiti e di patologie cutanee
 - trattamenti farmacologici topici o fotosensibilizzanti in atto
 - soggetti che rispondono in modo anomalo alle radiazioni solari
 - soggetti che fanno uso di lampade abbronzanti
 - donne in gravidanza e in fase di allattamento
 - minorenni
 - soggetti che abbiano partecipato a prove analoghe nei due mesi precedenti
- a ciascun volontario viene consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il quale il volontario esprime il libero consenso al test e di non trovarsi in alcuna delle condizioni di esclusione dal test.

Procedura: le misurazioni vengono effettuate sulla schiena. I volontari, prima dell'applicazione, vengono fatti acclimatare per 20 minuti nelle condizioni ambientali di lavoro ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $50\% \pm 5\%$ U.R.). Ciascun prodotto viene distribuito su un'area di circa:

- COLIPA/JCIA/CTFA-SA/CTFA US : 30-60 cm^2
- FDA : $\geq 50 \text{ cm}^2$

e la dose di prodotto che viene utilizzata è di:

- COLIPA/JCIA/CTFA-SA/CTFA US : $2.00 \text{ mg} / \text{cm}^2 \pm 2.5\%$.
- FDA : $2.00 \text{ mg} / \text{cm}^2$

Tale zona viene poi irradiata con dosi UV scalari con le seguenti progressioni:

- COLIPA/JCIA/CTFA-SA/CTFA US : 1.25 per $\text{spf} < 25$; 1.12 per $\text{spf} \geq 25$
- FDA : 0.64 – 1.56 volte il valore atteso per $\text{spf} < 8$; 0.69 – 1.44 volte il valore atteso per $8 \leq \text{spf} \leq 15$; 0.76 – 1.32 volte il valore atteso per $\text{spf} > 25$

mediante un simulatore della luce solare per un tempo proporzionale al valore del fattore di protezione atteso.

Le valutazioni vengono effettuate dallo sperimentatore dopo 22-24 ore (FDA) o dopo 16-24 ore (COLIPA/JCIA/CTFA-SA/CTFA US;) dall'esposizione alle radiazioni UV.

Il test consiste nell'individuare la minima dose di radiazione ultravioletta (MED = Minimal Erythmal Dose) in grado di provocare un lieve e circoscritto arrossamento della cute. La procedura viene applicata dapprima sulla cute priva di protezione ($MED_{Unprotected\ skin}$) e dopo sulla cute protetta con il prodotto solare ($MED_{Protected\ skin}$).

Il fattore di protezione solare è dato dal rapporto tra MED_p / MED_U .

Almeno un prodotto di riferimento viene usato in ogni test, come previsto dai relativi metodi.

- COLIPA/JCIA/CTFA-SA/CTFA US:

REF.	Valore medio	Range ($\pm SD$)
P2	16.6	14.2-19.0
P3	16.2	13.8-18.7
P7	5.1	4.4-5.9

- FDA: HS 8%



Strumentazione: Multiport UV Solar Simulator Model 601 (300W): sono simulatori della luce solare, che emanano radiazioni ultraviolette nella regione compresa tra 290 e 400 nm.

Sono costituiti da 6 uscite indipendenti che possono essere utilizzate contemporaneamente per effettuare il test; L'intensità delle uscite viene determinata prima dell'uso mediante detector opportunamente calibrato (UVA- detector e UVB- erythema detector).

Metodi:

- COLIPA/JCIA/CTFA-SA/CTFA US 2006
- FDA (descritto all'interno della "Final FDA Sunscreen Monograph" pubblicato in FR 21/5/1999 – vol 64, n° 98, pag. 27666 – 27693)

Analisi e valutazione risultati:

- COLIPA/JCIA/CTFA-SA/CTFA US:

L'SPF per il prodotto è la media aritmetica di tutti i valori di SPF individuale del panel test di soggetti selezionati ed espresso con un decimale dopo la virgola.

Dapprima si calcola la media dei valori di SPF ottenuti da almeno 10 volontari, poi si calcola la deviazione standard ed infine l'intervallo di confidenza (CI_n) al 95%.

Qualora il CI_n [%] risultasse maggiore del 17% del valore medio di SPF calcolato nei 10 volontari, il test deve continuare reclutando altri volontari fin tanto che CI_n [%] \leq 17% del valore di SPF medio.

□ FDA

Vengono considerati innanzitutto i valori di SPF di ciascun individuo. Di questi viene effettuata la media (X), deviazione standard (s) e l'intervallo di confidenza al 95% (A).

SPF è dato dal numero intero, arrotondato per difetto, calcolato come $X - A$

COLIPA		FDA	
TIPO	SPF	TIPO	SPF
Basso	6-10	Minimo	$2+A < SPF < 12+A$
Medio	15-20-25		
Alto	30-50	Moderato	$12+A < SPF < 30+A$
Molto alto	50+	Alto	$30+A < SPF$

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — statistiche — discussione dei risultati — firma.

2. Valutazione in vivo della resistenza all'acqua di prodotti solari

Scopo del saggio: il test ha lo scopo di determinare se un prodotto solare può considerarsi "resistente all'acqua" o molto resistente all'acqua" come previsto dal metodo FDA e dalle linee guida COLIPA.



Procedura:

▪ Metodo FDA:

Per questo tipo di test vengono seguite le procedure descritte all'interno della "Final FDA Sunscreen Monograph".

In queste procedure di valutazione viene utilizzata una mini-piscina Jacuzzi con acqua fresca e al coperto mantenuta ad una temperatura da 23 a 32°C.

Per i prodotti solari che recano la dichiarazione "*water resistant*" il valore da riportare in etichetta deve essere quello determinato dopo 40 minuti di immersione in acqua utilizzando il seguente procedimento di valutazione:

- Applicazione del prodotto solare (si fa seguire un periodo di attesa dopo l'applicazione del prodotto solare indicata nell'etichettatura del prodotto stesso)
 - 20 minuti di moderata attività in acqua.
 - 20 minuti di riposo (non tamponare l'area del test con asciugamano)
 - 20 minuti di moderata attività in acqua.
- Si lascia asciugare la cute all'aria senza tamponare con asciugamano.
 - Si inizia l'esposizione delle aree del test con il simulatore solare secondo procedure indicate nel metodo.

Per i prodotti solari che recano la dichiarazione "*very water resistant*" il valore da riportare in etichetta deve essere quello determinato dopo 80 minuti di immersione in acqua utilizzando il seguente procedimento di valutazione:

- Applicazione del prodotto solare (si fa seguire un periodo di attesa dopo l'applicazione del prodotto solare indicata nell'etichettatura del prodotto stesso)
- 20 minuti di moderata attività in acqua + 20 minuti di riposo (non tamponare l'area del test con asciugamano)
- 20 minuti di moderata attività in acqua + 20 minuti di riposo (non tamponare l'area del test con asciugamano)
- 20 minuti di moderata attività in acqua + 20 minuti di riposo (non tamponare l'area del test con asciugamano)
- 20 minuti di moderata attività in acqua quindi si lascia asciugare la cute all'aria senza tamponare con asciugamano
- Si inizia l'esposizione delle aree del test con il simulatore solare secondo procedure indicate nel metodo

▪ Metodo COLIPA:

Per questo tipo di test vengono seguite le procedure descritte dal COLIPA International Sun Protection Factor (SPF).

Il principio di tale test consiste nel confrontare l'SPF ottenuto dopo immersione in acqua su mini-piscina Jacuzzi con quello statico determinato con metodo internazionale COLIPA per la determinazione dell' SPF.

L'SPF "statico" viene pertanto determinato in accordo con il metodo internazionale COLIPA mentre per determinare l'SPF "bagnato" viene seguita la seguente procedura:

- ❑ Attesa di 15-20 minuti in seguito ad applicazione del prodotto solare
- ❑ Immersione di 20 minuti in acqua
- ❑ Attesa di 15 minuti senza tamponare con asciugamano (tempo di asciugatura)
- ❑ Immersione di 20 minuti in acqua
- ❑ Attesa di altri 15 minuti o comunque fino a completa asciugatura

Per prodotti solari aventi una resistenza all'acqua extra e che pertanto recano in etichetta la dicitura "very water resistant" il ciclo di immersione in acqua viene raddoppiato:

- ❑ Attesa di 15-20 minuti in seguito ad applicazione del prodotto solare
- ❑ Immersione di 20 minuti in acqua
- ❑ Attesa di 15 minuti senza tamponare con asciugamano (tempo di asciugatura)
- ❑ Immersione di 20 minuti in acqua
- ❑ Attesa di altri 15 minuti senza tamponare con asciugamano (tempo di asciugatura)
- ❑ Immersione di 20 minuti in acqua
- ❑ Attesa di altri 15 minuti senza tamponare con asciugamano (tempo di asciugatura)
- ❑ Immersione di 20 minuti in acqua
- ❑ Attesa di altri 15 minuti o comunque fino a completa asciugatura

Tale test prevede che su almeno 10 volontari venga dapprima calcolato il valore SPF "statico" (prima) e quello "bagnato" (dopo immersione in acqua) e sulla base dei risultati ottenuti venga calcolata la percentuale media di ritenzione del prodotto solare sulla cute rispetto all' SPF "statico" e questa raggiunge o meglio supera il 50% allora il solare può essere etichettato "resistente all'acqua" o "molto resistente all'acqua" se sono state fatti 4 cicli di immersione.

Strumentazione: *Multiport UV Solar Simulator Model 601 (300W)*: sono simulatori della luce solare, che emanano radiazioni ultraviolette nella regione compresa tra 290 e 400 nm.

Sono costituiti da 6 uscite indipendenti che possono essere utilizzate contemporaneamente per effettuare il test; L'intensità delle uscite viene determinata prima dell'uso mediante detector opportunamente calibrato (UVA-detector e UVB- erythema detector). Almeno un prodotto di riferimento viene usato in ogni test.

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — statistiche — discussione dei risultati — firma.

3. Determinazione in vitro dello spettro di assorbimento (290-400 nm) e del fattore di protezione solare (SPF)

Scopo del saggio: lo scopo del metodo è quello di calcolare il Fattore di Protezione Solare, il livello di protezione UVA e di determinare lo spettro di assorbimento UV di un film di prodotto cosmetico solare.

Strumentazione: Labsphere UV-2000S (UV transmittance analyzer)

La trasmittanza è la percentuale di energia in grado di attraversare il campione in funzione della lunghezza d'onda nello spettro dell'ultravioletto.

Il raggio campione viene generato all'interno della camera superiore della testa ottica e diretto attraverso il campione.

Lo spettro della radiazione incidente è selezionato mediante una fibra ottica attraverso una sfera e misurato da uno spettrografo. La radiazione ultravioletta dal raggio incidente che non è stata né riflessa né assorbita dal campione è registrata dalla camera inferiore della testa ottica e misurato da un secondo spettrografo. La trasmittanza del campione in esame si calcola mediante il rapporto tra il flusso di radiazione diffusa e il flusso di radiazione incidente.

Preparazione del campione: l'UV-2000S opera attraverso la misurazione della trasmittanza diffusa, di un campione accuratamente preparato.

La preparazione del campione è la fase più delicata, deve, infatti, simulare le condizioni di applicazioni usate per il test in vivo sia per quanto riguarda la quantità di prodotto applicata, sia per la sua interazione con il substrato.

Il substrato utilizzato come supporto per il prodotto solare deve simulare le caratteristiche di consistenza e porosità della cute, deve, inoltre, essere trasparente alla radiazione UV.

Substrati utilizzati:



VITROSKIN: è una sorta di pelle sintetica prodotta dalla IMS Inc. ampiamente utilizzata per le analisi dei prodotti solari in vitro. Una volta idratato, infatti, il Vitro-Skin assume una consistenza molto simile alla pelle umana.

Il Vitro-Skin viene, dapprima, idratato seguendo la metodica fornita dal costruttore; per ciascun campione vengono preparati dei provini di dimensioni di 9.0 cm x 6.2 cm di Vitro-Skin. Il campione viene distribuito omogeneamente sul vetrino cercando di porre una quantità approssimativa di 2 mg/cm².

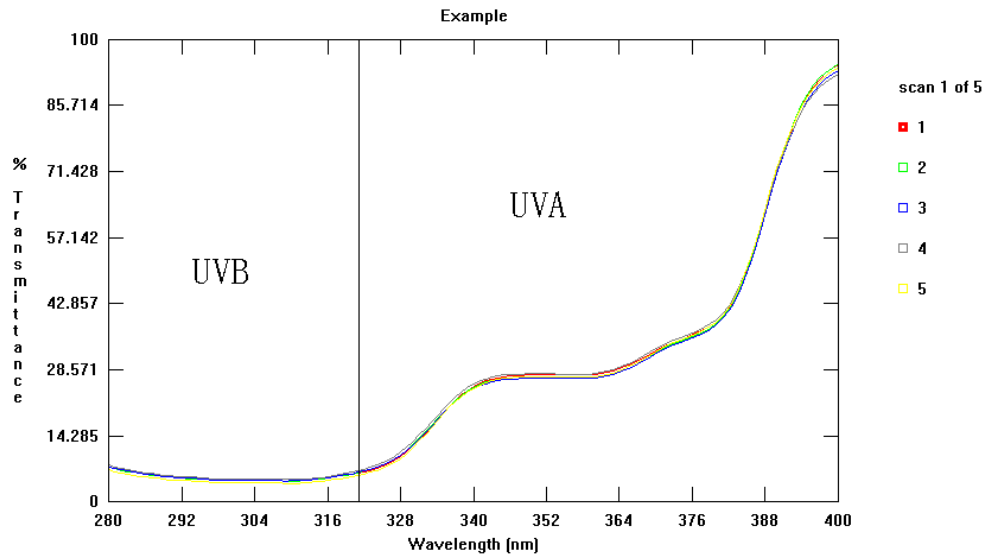
Con questo substrato è possibile effettuare la valutazione del fattore di protezione SPF in vitro e delle relative caratteristiche dello spettro di assorbimento anche dopo l'immersione del provino in acqua. Per

allinearsi alle linee guida COLIPA per la determinazione del water resistance in vivo (vedasi scheda 2) saranno effuate due immersioni consecutive di 20 + 20 minuti in acqua con un tempo di attesa di 15 minuti.

PMMA Plates: si tratta di una piastra di plexiglas (polymethylmethacrylate Plexiglas™) con una superficie ruvida 50 x 50 x 2.5 mm. Il campione viene distribuito omogeneamente sul vetrino cercando di porre una quantità approssimativa di 0.75 mg/cm².

Risultati:

- ☐ **Spettro di assorbimento (290-400 nm)**



- ☐ **Parametri rilevati:** SPF medio, % di tramittanza per UVA e UVB, UVA ratio, Lunghezza d'onda critica (nm)

Metodi: Metodo Diffey-Robson "A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum" J.Soc.Cosmet. Chem.,40, 127-133, 1989.

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — protocollo — risultati — firma.

4. *Determinazione in vitro del fattore di protezione UVA e lunghezza d'onda critica secondo linee guida COLIPA*

Scopo del test: determinazione in vitro del fattore di protezione UVA su prodotti solari. Il metodo è stato validato mediante "ring test" che hanno stabilito una significativa correlazione con i risultati ottenuti in vivo su volontari utilizzando il Persistent Pigment Darkening (PPD) method.

Strumentazione: Labsphere UV-2000S (UV transmittance analyzer)

La trasmittanza è la percentuale di energia in grado di attraversare il campione in funzione della lunghezza d'onda nello spettro dell'ultravioletto.

Il raggio campione viene generato all'interno della camera superiore della testa ottica e diretto attraverso il campione.

Lo spettro della radiazione incidente è selezionato mediante una fibra ottica attraverso una sfera e misurato da uno spettrografo. La radiazione ultravioletta dal raggio incidente che non è stata né riflessa né assorbita dal campione è registrata dalla camera inferiore della testa ottica e misurato da un secondo spettrografo. La trasmittanza del campione in esame si calcola mediante il rapporto tra il flusso di radiazione diffusa e il flusso di radiazione incidente.

Sorgente UV pre-irradiazione:

Long-arc xenon Atlas Suntest™ insolator , type CPS, CPS+

Preparazione del campione: 0.75 mg/cm² di prodotto solare vengono applicati e distribuiti più omogeneamente possibile su un apposito substrato PMMA plates. Si tratta di una piastra di plexiglas con una superficie ruvida 50 x 50 x 2.5 mm.

Il campione viene distribuito sulla superficie del piatto mediante una micro-siringa. Il prodotto viene distribuito utilizzando un pre-saturato finger-cot. La spalmatura del campione è un momento critico e importante pertanto deve essere fatta seguendo una ben definita procedura: per circa 30 secondi, l'emulsione viene spalmata con una leggera pressione e quindi con una pressione più elevata per altri 30 secondi. Dopo l'applicazione il piatto viene lasciato al buio per circa 15 minuti.

Come substrato di riferimento viene utilizzato un vetrino precedentemente spalmato con uno strato omogeneo di glicerina.

La glicerina sul substrato di riferimento serve come bianco poiché non contiene sostanze che assorbono. Le misure di trasmissione vengono effettuate in almeno 4 punti per ciascun vetrino.

Misure e calcoli: il test associa il metodo in vivo per la determinazione del fattore di protezione solare SPF (in vivo SPF –metodo COLIPA) con i vantaggi del metodo in vitro mediante misure di trasmittanza.

Per la misura dell'in vitro UVA, bisogna seguire i seguenti 6 steps:

1. acquisizione dello spettro di assorbimento del film sottile di solare precedentemente spalmato sul vetrino.
2. aggiustamento della curva tutti i valori di trasmittanza che costituiscono la curva di assorbimento da 290-400 nm (regione di assorbimento UVA e UVB) vengono moltiplicati per uno stesso coefficiente (c) al fine di far coincidere il risultato ottenuto in vitro con SPF ottenuto dal test COLIPA in vivo.



3. Calcolo della protezione UVA (UVAPF₀) usando lo spettro normalizzato (da 320 a 400 nm) e calcolo della dose "D". Il calcolo della dose D è dedotto dal valore dell' UVAPF₀.
4. Esposizione del campione al SUN TEST per il tempo dedotto dal valore dell' UVAPF₀ (step 3).
5. Acquisizione dello spettro di assorbimento del film sottile di solare precedentemente spalmato sul vetrino dopo l'esposizione al SUN TEST (secondo spettro di assorbimento).
6. Aggiustamento del secondo spettro utilizzando il coefficiente C precedentemente calcolato (step 2) e calcolo dell'UVAPF in vitro e lunghezza d'onda critica.

Metodi: Method for the in vitro determination of UVA protection provided by sunscreen products Guideline 2009 prepared by the COLIPA in vitro photoprotection Methods Task Force

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — firma.

5. Determinazione in vitro della foto-stabilità dei filtri UV

Scopo del test: il test intende valutare in vitro la foto-stabilità dei "UV-absorbing cosmetic products" ovvero dei FILTRI-UV contenuti nei prodotti solari.

In particolare, si utilizza un modello in vitro per determinare analiticamente la concentrazione dei filtri UV prima e dopo l'esposizione ad una dose controllata di radiazione UV proveniente da una sorgente definita e controllata "standard sun".

Strumentazione: per la determinazione della concentrazione dei filtri UV si utilizza come strumento l'HPLC (High Performances Liquid Chromatography).

Il COLIPA, infatti, ritiene l'utilizzo dell' HPLC per quantificare la concentrazione dei filtri, prima e dopo l'esposizione ai raggi UV, uno strumento inequivocabile per stabilire la foto-stabilità dei filtri qualora il test venga associato anche ad altre metodologie per stabilire l'efficacia dei filtri come ad esempio in vivo SPF test in accordo con il COLIPA International Sun Protection Factor test method

Principi di misura: la misura della concentrazione di filtri prima (T0) e dopo l'esposizione a raggi UV (T1) è effettuata cercando il più possibile di simulare le condizioni di utilizzo reali del prodotto solare. A questo scopo sia al T0 sia al T1 il prodotto solare viene spalmato su un opportuno substrato nella stessa quantità che viene utilizzata nel test in vivo per la determinazione del fattore di protezione solare SPF (COLIPA International Sun Protection Factor) ovvero in ragione di 2 mg/cm2.

I vetrini preparati per il T1 sono, quindi, esposti alla luce solare utilizzando come sorgente il simulatore solare SUN TEST della ATLAS opportunamente calibrato al fine di assicurare un'appropriata distribuzione della radiazione UV. Vengono, infatti, rispettate le proporzioni di rapporto UV-A / UV-B previste dal COLIPA. Lo spettro della sorgente UV è il più vicino possibile a quello dello "standard sun" definito dal COLIPA (1994) e dal DIN67501 (1996).

Long-arc xenon Atlas Suntest™ insulator , type CPS, CPS+

I campioni sono esposti ad una dose ben definita di radiazione : **250 kJ/m2 di UVR**. Come previsto dal protocollo COLIPA si è scelto di mantenere una dose di radiazione costante ed indipendente dal fattore di protezione indicato in etichetta al fine di sottoporre tutti i campioni alle stesse condizioni.

L'applicazione di una dose pari a 250 kJ/m2 di UVR che rende il test molto spinto è stata scelta per le seguenti ragioni:

- È equivalente a 5 MED o a 81 minuti sotto il sole allo zenit.
- È sufficiente per dimostrare l'instabilità dei filtri solari all'interno di formulazioni solari, si può arrivare infatti, per alcuni prodotti solari presenti sul mercato, ad una foto-degradazione del 100%

Tutti i vetrini (T0 e T1) sono analizzati mediante HPLC dopo estrazione con opportuno solvente. Tutte le analisi vengono effettuate in doppio.

Calcoli: a seguito dell'analisi cromatografica, la concentrazione residua di ciascun filtro contenuto nel campione irradiato (T1) viene calcolata rispetto a quella del campione pre-irradiato (T0) mediante la seguente relazione:

$$\text{Residual Concentration}(\%) = \frac{\text{concentration}(T_1)}{\text{concentration}(T_0)} * 100$$

concentration (T1) : concentrazione del filtro DOPO l'irradiazione con UVR

concentration (T0) : concentrazione del filtro PRIMA dell'irradiazione.



E', inoltre, calcolata la foto-degradazione relativa % mediante la seguente relazione :

$$\text{Relative Photodegradation(\%)} = \left[1 - \frac{c_{\gamma}}{c_{\beta}} \right] * 100$$

C_{β} : concentrazione del filtro PRIMA (T0) dell'irradiazione.

C_{γ} : concentrazione del filtro DOPO (T1) l'irradiazione con 250 kJ/m2 di UVR.

Metodo: "DETERMINATION OF PHOTOSTABILITY OF UV FILTERS IN COSMETIC PRODUCTS" final draft version
Approved by the COLIPA Program Committee "Product Management" Guideline / Protocol – December 2003 –
Prepared by the COLIPA TF "Photostability of sun care products".

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — firma.

6. Fototossicità secondo OECD 432 "OECD 432 In vitro 3T3 phototoxicity test (2004)"

La **fototossicità** è una reazione acuta che può essere causata da un singolo trattamento con una sostanza contemporaneamente all'esposizione alle radiazioni visibili o UV. Alcune linee guida internazionali riportano delle raccomandazioni per la conduzione di studi di fototossicità, tuttavia la OCSE non ha ancora accettato una linea guida per studi di fotoirritazione in vivo, ma ha raccomandato l'uso di saggi in vitro, prima di ricorrere ai test con gli animali (OCSE, 1996). I metodi in vitro sviluppati in questo settore comprendono saggi per lo screening di sostanze fototossiche, che usano principalmente cellule in coltura, e modelli basati sui meccanismi molecolari e cellulari della fototossicità. Di questi solo uno, il saggio di assunzione di rosso neutro con cellule Balb/c 3T3, è stato considerato scientificamente valido da ESAC (ECVAM, 1998a) e il protocollo, già presente nella Direttiva europea 86/609 (B 41. In vitro 3T3 NRU phototoxicity test) e nella linea guida OECD 432, pubblicato ECVAM INVITTOX PROTOCOL n°78, è adottato dal laboratorio Chelab per la verifica della fototossicità di prodotti cosmetici.

Saggio di assunzione del rosso neutro con cellule Balb/c3T3

Il saggio 3T3 NRU PT prevede l'uso di fibroblasti di topo (Balb/c 3T3, clone 31), sui quali, dopo trattamento con la sostanza in esame e dopo opportuno irraggiamento, viene effettuato il test di assunzione del rosso neutro.

Questo è un test di vitalità che si basa sull'assorbimento del colorante vitale all'interno dei lisosomi delle cellule ancora integre. Il saggio di assunzione del rosso neutro è stato pubblicato per la prima volta nel 1985 (Borenfreund e Puerner, 1985) come possibile alternativa in vitro al test di Draize sul coniglio ed utilizzato, sia pure dopo lievi aggiustamenti, per evidenziare il potere irritante di sostanze di varia natura. Successivamente il protocollo è stato modificato per adattarlo al test di fototossicità, introducendo una fase di incubazione con la sostanza in esame prima dell'irraggiamento ed utilizzando una soluzione di sali di Earles come mezzo di incubazione delle cellule durante il periodo di irraggiamento.

I dati ottenuti della vitalità cellulare del campione e della sostanza di riferimento vengono elaborati con apposito software, riconosciuto e approvato da ECVAM in specifico per tale test, per ottenere la IC50 (con e senza trattamento UVA) che viene espressa come concentrazione mg/mL per il campione e come □g/mL per il controllo positivo.

Viene così calcolato il fattore di foto-irritazione (PIF) con la seguente formula:

$$\text{PIF} = \text{IC50} (-\text{uva}) / \text{IC50} (+\text{uva})$$

Secondo la linea guida OECD 432 il campione in esame:

- Non è fototossico se $\text{PIF} < 2$
- È probabilmente fototossico se $2 < \text{PIF} < 5$
- È fototossico se $\text{PIF} > 5$

Durante la fase di prevalidazione e lo studio di validazione internazionale vero e proprio (EU/COLIPA) che è stato condotto da 9 laboratori con risultati riproducibili, il test ha dimostrato di essere predittivo e di saper discriminare tra sostanze fotoirritanti e non.

7. Valutazione dell'idratazione cutanea – short term test

Scopo del saggio: il test si propone di valutare l'eventuale miglioramento dell'idratazione della cute in seguito ad un trattamento cosmetico idratante.

Soggetti sottoposti all'esperienza:

- ❑ n° 20 - 60 soggetti, età: 18 – 60, sesso: M/F
- ❑ criteri di selezione dei volontari:
 - Buono stato di salute
 - Assenza di patologie cutanee
 - Assenza di trattamenti farmacologici topici in atto
 - Anamnesi negativa per atopia
 - Impegno a non usare altri prodotti topici nella zona da trattare nelle 24h precedenti le misurazioni
 - Esclusioni: donne in gravidanza e allattamento, minorenni
- ❑ a ciascun volontario viene consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il quale il volontario esprime il libero consenso al test e di non trovarsi in alcuna delle condizioni di esclusione dal test

Disegno sperimentale: possono essere utilizzati uno o più dei seguenti disegni sperimentali

- ❑ confronto con non trattato
- ❑ attivo contro placebo
- ❑ benchmark di mercato ad efficacia riconosciuta
- ❑ confronto tra prodotti con diversa formulazione

Condizione:

- ❑ distribuzione casuale dei trattamenti sulle zone controlaterali
- ❑ trattandosi di un test a breve termine con rilevazioni strumentali del risultato non vi è la necessità di condurre il test in cieco o doppio cieco.

Schema di esecuzione del saggio:

- ❑ l'idratazione cutanea viene normalmente misurata sulla superficie volare dell'avambraccio dei volontari.
- ❑ I volontari vengono fatti acclimatare per 20 minuti nelle condizioni ambientali ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $50\% \pm 5\%$ U.R.). Le misurazioni vengono eseguite dallo stesso operatore prima del trattamento e ai seguenti intervalli di tempo dall'applicazione: 30 - 60 - 90 - 120 - 360 minuti e 24 ore.
- ❑ Il campione viene applicato su zone predefinite ($16\text{ cm}^2/\text{zona}$) e l'assorbimento facilitato mediante massaggio di un operatore dotato di finger-cot garantendo un'applicazione media pari a $2\text{ mg prodotto}/\text{cm}^2$.

Strumentazione: le misurazioni vengono effettuate con il CORNEOMETER CM 825, un misuratore di 'capacitanza' a bassa frequenza, sensibile alla costante dielettrica relativa (o permittività) del materiale posto in contatto con la superficie dell'elettrodo. Lo strato corneo dell'epidermide rappresenta un medium dielettrico le cui proprietà variano in funzione del contenuto d'acqua. Questa misurazione è basata sulla grande differenza della costante dielettrica dell'acqua (81) e quella delle altre sostanze (< 7) e fornisce una stima del contenuto d'acqua dell'epidermide a una profondità relativa di 60 - 100 μm .

Linee guida: "Assessment of stratum corneum hydration according EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods." Skin Research and Technology 1997; 3: 126-132



Analisi e valutazione risultati: trattamento statistico dei dati.

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — statistiche — discussione dei risultati — firma.

7. Perdita d'acqua per traspirazione (TEWL) – short term test

Scopo del saggio: il test si propone di valutare l'eventuale influenza di un trattamento cosmetico sulla funzione di barriera all'acqua della cute attraverso la misura della perdita d'acqua per evaporazione (TEWL).

Valori elevati di TEWL sono, infatti, indice di una alterazione sfavorevole della integrità della funzione barriera della cute, mentre valori non alterati o inferiori a quelli basali indicano, al contrario, che è invariato o migliorato l'effetto barriera della cute. La TEWL viene anche utilizzata nei test di compatibilità a conferma della valutazione clinica per arrivare a conclusioni maggiormente oggettive e meglio supportate.

Soggetti sottoposti all'esperimento:

- n° 20 - 60 soggetti, età: 18 – 60, sesso: M/F
- criteri di selezione dei volontari:
 - Buono stato di salute
 - Assenza di patologie cutanee
 - Assenza di trattamenti farmacologici topici in atto
 - Anamnesi negativa per atopia
 - Impegno a non usare altri prodotti topici nella zona da trattare nelle 24h precedenti le misurazioni.
 - Esclusioni: donne in gravidanza e allattamento, minorenni
- a ciascun volontario viene consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il quale il volontario esprime il libero consenso al test e di non trovarsi in alcuna delle condizioni di esclusione dal test

Disegno sperimentale: possono essere utilizzati uno o più dei seguenti disegni sperimentali

- confronto con non trattato
- attivo contro placebo
- controllo positivo
- confronto tra prodotti

Condizione:

- distribuzione casuale dei trattamenti sulle zone controlaterali
- trattandosi di un test a breve termine con rilevazioni strumentali del risultato non vi è la necessità di condurre il test in cieco o doppio cieco

Schema di esecuzione del saggio:

- la TEWL viene normalmente misurata sulla superficie volare dell'avambraccio dei volontari.
- I volontari vengono fatti acclimatare per 20 minuti nelle condizioni ambientali ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $50\% \pm 5\%$ U.R.). Le misurazioni vengono eseguite prima del trattamento e dopo 30 – 120 – 360 minuti e 24 ore dall'applicazione.
- Il campione viene applicato su zone predefinite ($16 \text{ cm}^2/\text{zona}$) e l'assorbimento facilitato mediante massaggio di un operatore dotato di finger-cot garantendo un'applicazione media pari a $2 \text{ mg prodotto}/\text{cm}^2$.

CHELAB®

Strumentazione: la misurazione viene eseguita con TEWAMETER TM 210. All'interno della sonda sono localizzati i sensori per il rilevamento dell'umidità relativa e della temperatura, l'elettronica di controllo ed il chip contenente i valori di taratura. La testa misuratrice è costituita da un cilindro cavo (diametro 10mm, altezza 20mm) progettato per ridurre al minimo l'influenza dell'aria ed eventuali turbolenze.

Linee guida: "Assessment of water evaporation through skin (Trans Epidermal Water Loss according to Guidelines for TEWL measurement." Contact Dermatitis 1990; 22: 164-178

Analisi e valutazione risultati: trattamento statistico dei dati

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — statistiche — discussione dei risultati — firma.

9. Valutazione dell'attività sebonormalizzante – long term test

Scopo del saggio: il test consente di valutare in vivo l'attività sebo-normalizzante di un trattamento cosmetico mediante la quantificazione strumentale, associata ad una valutazione clinica da parte di un dermatologo, della secrezione sebacea prima, durante e dopo il trattamento.

Soggetti sottoposti all'esperimento:

- n° 20 soggetti, età: 18 – 60, sesso: M/F, possibilmente rappresentativi dei potenziali consumatori del prodotto, quindi soggetti con pelle grassa.
- criteri di selezione dei volontari:
 - Buono stato di salute
 - pelle grassa o untuosa
 - Assenza di patologie cutanee
 - Assenza di trattamenti farmacologici topici in atto
 - Anamnesi negativa per atopia
 - Impegno a non usare altri prodotti topici nella zona da trattare nelle 24h precedenti le misurazioni.
 - Esclusioni: donne in gravidanza e allattamento, minorenni
- a ciascun volontario viene consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il quale il volontario esprime il libero consenso al test e di non trovarsi in alcuna delle condizioni di esclusione dal test.

Disegno sperimentale: possono essere utilizzati uno o più dei seguenti disegni sperimentali

- attivo contro placebo
- controllo positivo o benchmark di mercato ad efficacia riconosciuta
- confronto tra 2 prodotti con diversa formulazione

Schema di esecuzione del saggio: il prodotto viene applicato dai volontari per un periodo totale di 30 giorni, secondo istruzioni fornite dal committente.

I volontari vengono fatti acclimatare per 20 minuti nelle condizioni ambientali ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $50\% \pm 5\%$ U.R.). Le misurazioni strumentali vengono effettuate in quattro tempi: T0 (prima dell'applicazione), T1 dopo 30 minuti dalla prima applicazione, T2 dopo 15 giorni, T30 fine del test. Mentre le valutazioni dermatologiche vengono effettuate al T0 e alla fine del trattamento con il prodotto cosmetico.

Strumentazione: la misurazione viene eseguita con il SEBUMETER SM810. Tale strumento utilizza come tecnica di campionatura del sebo un nastro polimerico opaco posto su un supporto rotante, che viene fatto avanzare manualmente dopo ogni misura. Il grado di trasparenza del film plastico è misurato da una fotocellula in seguito al doppio passaggio di luce attraverso il film stesso. Il risultato è valutato da un microprocessore attraverso uno standard interno e viene espresso come $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ di lipidi cutanei.

Linee guida: "EEMCO guidance for the in vivo assessment of Skin Greasiness" Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2000; 13: 372-389

Analisi e valutazione risultati: trattamento statistico dei dati

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — statistiche — discussione dei risultati — firma.

10. Prova di flessibilità di rossetti in vitro

Scopo del saggio: questo test empirico si applica a rossetti e lucidalabbra per valutarne la capacità del film di prodotto di restare adeso ad una superficie simulante le labbra, anche se sottoposto a stress. Come superficie simulante si utilizza una gomma di rugosità superficiale definita su cui si stende un film omogeneo di prodotto.

Schema di esecuzione della prova: su delle apposite strisce con peso e area noti si distribuisce un film omogeneo di prodotto cosmetico pari a 20 ± 2 mg. La striscia viene quindi collocata su un idoneo supporto che ne permette l'allungamento controllato. Si procede quindi allo strofinamento della superficie mediante un idoneo pennellino. Al termine di questa operazione la striscia viene rimossa e pesata. Si calcola quindi la percentuale di film rimosso. La prova va ripetuta almeno 10 volte per ciascuna formula cosmetica testata.

Analisi e valutazione risultati: il risultato si esprime come media % di film rimosso. Il valore di APWL (average percent weight loss) è un indice della resistenza del film cosmetico in termini di adesività e coesività. Un valore di APWL basso indica pertanto che il prodotto è in grado di rimanere adeso alla superficie simulante le labbra.

Metodo: tratto da Patent No "US 6,340,466 B1".

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — risultati — firma.

11. Prova di resistenza allo sfregamento di rossetti dopo dry-blot

Scopo del saggio: questo test empirico si applica ai rossetti per valutarne la capacità di resistere al trasferimento di colore quando vengono sfregati mediante fazzoletti o altre superfici non unte. Come superficie simulante si utilizzano fogli di collagene su cui si stende un film omogeneo di prodotto.

Schema di esecuzione della prova: si avvolgono dei fogli di collagene, precedentemente re-idratati, su degli appositi vetrini. Si stende un film sottile e omogeneo di prodotto cosmetico che viene lasciato a condizionare per almeno 16 ore (temperatura e umidità controllate). Si mette a contatto del film cosmetico un disco di styrofoam incollato all'estremità di un cilindro avente forma e peso definito. Si fa ruotare di 360° tale applicatore sul film. Si misura la percentuale di riflettanza da 400 a 700 nm dello styrofoam dopo il contatto e lo sfregamento contro il film cosmetico.

Il test viene ripetuto almeno cinque volte per ciascun prodotto.

Strumentazione: Spettrofotometro Datacolor Spectraflash 450, geometria d/8, illuminate/osservatore std. D65/10deg

Metodo: tratto da Patent No "US 6,340,466 B1"

Analisi e valutazione risultati: ANPR (Average Normal Percent Reflectance) il valore di ANPR è indice della resistenza del film cosmetico. Tanto più è elevato tale valore tanto più bassa sarà la capacità a resistere al trasferimento del colore.

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — risultati — firma.

12. Prova di resistenza allo sfregamento di rossetti dopo oil-blot

Scopo del saggio: questo test empirico si applica ai rossetti per valutarne la capacità di resistere al trasferimento di colore quando viene a contatto con oggetti o cibi oleosi o con sebo cutaneo. Come superficie simulante si utilizzano fogli di collagene su cui si stende un film omogeneo di prodotto.

Schema di esecuzione della prova: si avvolgono dei fogli di collagene, precedentemente re-idratati, su degli appositi vetrini. Si stende un film sottile e omogeneo di prodotto cosmetico che viene lasciato a condizionare per almeno 16 ore (temperatura e umidità controllate). Si applica una quantità nota di olio di oliva sul film di collagene e con un apposito pennellino si distribuisce l'olio sulla superficie. Si lascia a riposo per 30 minuti. Si toglie l'eccesso di olio dalla superficie del film tamponando delicatamente. Si mette a contatto del film cosmetico un disco di styrofoam incollato all'estremità di un cilindro avente forma e peso definito. Si fa ruotare di 360° tale applicatore sul film. Si misura la percentuale di riflettanza da 400 a 700 nm dello styrofoam dopo il contatto e lo sfregamento contro il film cosmetico. Il test viene ripetuto almeno cinque volte per ciascun prodotto.

Strumentazione: Spettrofotometro Datacolor Spectraflash 450, geometria d/8, illuminate/osservatore std. D65/10deg.

Metodo: tratto da Patent No "US 6,340,466 B1"

Analisi e valutazione risultati: ANPR (Average Normal Percent Reflectance) il valore di ANPR è indice della resistenza del film cosmetico. Tanto più è elevato tale valore tanto più bassa sarà la capacità a resistere al trasferimento del colore.

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — risultati — firma.

13. Prova di resistenza all'acqua di mascara in vitro

Scopo del saggio: Questo test si applica ai mascara per valutarne la capacità di resistere all'acqua.

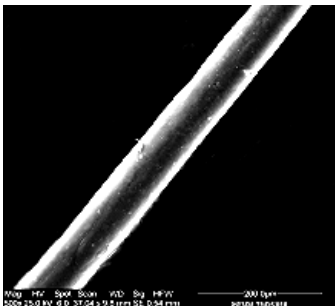
SCHEMA DI ESECUZIONE DELLA PROVA

1) PROCEDIMENTO

- ❑ Su un provino costituito da ciglia finte derivate da capelli naturali si stende, mediante l'applicatore del prodotto, un film sottile ed omogeneo di mascara e si lascia asciugare per 15 minuti a 23 ± 2 °C e $50 \pm 5\%$ UR.
- ❑ Si esegue il seguente ciclo:
- ❑ Immergere ciascun provino in un contenitore con acqua di rete ($T 23 \pm 2$ °C) 10 minuti in acqua sotto agitazione costante utilizzando un agitatore meccanico dotato di controllo digitale ed impostato a 100 RPM.
- ❑ Estrarre il provino dal contenitore e asciugare per 10 minuti a 23 ± 2 °C e $50 \pm 5\%$ UR.
- ❑ Immergere nuovamente il provino in acqua per 10 minuti sotto agitazione costante utilizzando un agitatore meccanico dotato di controllo digitale ed impostato a 100 RPM.
- ❑ Lasciar asciugare le ciglia senza tamponare su una superficie di styrofoam bianco per 15 minuti a 23 ± 2 °C e $50 \pm 5\%$ UR.

2) VALUTAZIONE

- ❑ visiva, associata a materiale iconografico, della perdita di colore da parte del cosmetico sia su styrofoam, sia nell'acqua dove sono state immerse le ciglia (vedasi esempio nella fotografia sottostante)
- ❑ mediante osservazione al S.E.M. (microscopio elettronico a scansione): frammenti di ciglia vengono prima montati su supporti idonei e poi metallizzati con oro per ottenere la massima risoluzione microscopica (vedasi esempi nelle foto sottostanti).



Non trattato

Disegno sperimentale:

- ❑ Valutazione rispetto al bianco (non trattato)
- ❑ Valutazione rispetto a leader di mercato ad efficacia riconosciuta
- ❑ Confronto tra prodotti con diversa formulazione

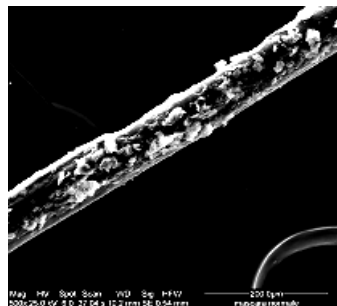
Strumentazione: S.E.M.: microscopio elettronico a scansione.

Macchina fotografica digitale Canon Power Shot G6

Agitatore meccanico a controllo digitale

Metodo: interno

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione - risultati derivati da valutazione visiva, foto scaricate da macchina fotografia digitale e foto scaricate da S.E.M. - firma.



Mascara normale



Mascara water-resistant

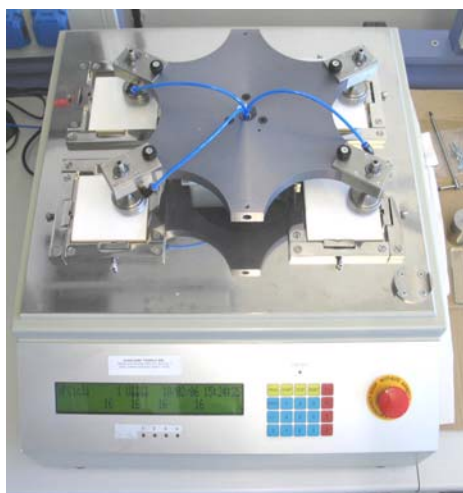
14 . Prova di resistenza all'acqua di eye-liner in vitro

Scopo del saggio: questo test si applica a prodotti eyeliner per valutarne la capacità di resistere all'acqua.

SCHEMA DI ESECUZIONE DELLA PROVA:

1) PREPARAZIONE: si avvolgono dei fogli di collagene, precedentemente re-idratati, su degli appositi vetrini. Al centro del vetrino si stende un film sottile ed omogeneo di eye-liner che viene lasciato condizionare per almeno 30 minuti.

2) ESECUZIONE DELLA PROVA



- ❑ I vetrini così preparati vengono posti su un apposito strumento: ABRASIOMETRO TIPO MARTINDALE costituito da 4 testine che agiscono contemporaneamente (vedi foto riportata)
- ❑ Sulle basi porta campione abrasivo vengono posti dei dischetti di cotone imbibiti con 1 ml di acqua. Le testine vengono applicate ai bracci dello strumento e quindi opportunamente ancorati. Lo strumento viene quindi impostato affinché compia 16 passaggi sopra il vetrino con il collagene.
- ❑ Alla fine del ciclo, i dischetti di cotone vengono rimossi dagli appositi supporti, quindi fotografati a supporto visivo di quanto colore è stato trasferito al dischetto in seguito al contatto con il collagene al quale è stato applicato il cosmetico.

- ❑ Si misura la percentuale di riflettanza da 400 a 700 nm di ciascun dischetto, mediante Spettrofotometro Datacolor Spectraflash 450.

Disegno sperimentale:

- ❑ Valutazione rispetto al bianco (non trattato)
- ❑ Valutazione rispetto a leader di mercato ad efficacia riconosciuta
- ❑ Confronto tra prodotti con diversa formulazione

Strumentazione:

- ❑ Macchina fotografica digitale Canon Power Shot G6
- ❑ ABRASIOMETRO TIPO MARTINDALE
- ❑ Spettrofotometro Datacolor Spectraflash 450, geometria d/8, illuminate/osservatore std. D65/10deg.

Analisi e valutazione risultati: tanto più elevata sarà la percentuale di riflettanza tanto più bassa sarà la capacità di resistere al trasferimento di colore, e quindi il dischetto risulta di colore bianco.

Metodo: interno

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione - risultati derivati da valutazione visiva, foto scaricate da macchina fotografia digitale – risultati letture spettrofotometriche. - firma.

15. Analisi morfologica con SEM (microscopia elettronica a scansione) su ciocche di capelli naturali

Scopo del saggio: il presente studio ha la finalità di valutare l'effetto di prodotti cosmetici per capelli, su ciocche di capelli trattati e stressati mediante trattamento chimico.

Schema di esecuzione del test: il provino, costituito da capelli naturali, precedentemente stressati con trattamenti chimici, viene trattato (per un numero di volte precedentemente concordato con cliente) con il prodotto cosmetico in esame (shampoo – shampoo + balsamo etc.).

Durante ogni lavaggio il provino viene bagnato e trattato con il prodotto cosmetico in esame mediante un procedimento standardizzato ; successivamente viene risciacquato con acqua corrente e lasciato asciugare all'aria.

Al termine di ogni ciclo di tre lavaggi vengono eseguite le valutazioni strumentali al SEM.

Disegno sperimentale:

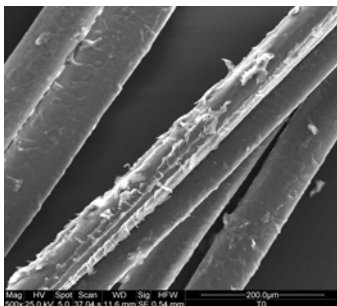
- Valutazione rispetto al bianco
- Valutazione rispetto a leader di mercato ad efficacia riconosciuta
- Confronto tra prodotti con diversa formulazione

Analisi e valutazione risultati: valutazione visiva, associata a materiale iconografico e mediante osservazione al microscopio elettronico a scansione S.E.M.

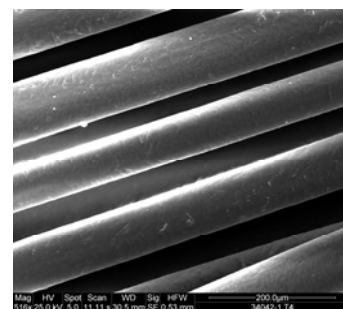
Strumentazione: microscopio elettronico a scansione S.E.M.

Metodo: interno

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — workplane — protocollo — risultati / immagini— discussione dei risultati — firma.



T0 capelli stressati



T3 capelli al termine del trattamento cosmetico

16. Patch–test in singola applicazione **Eseguito in collaborazione con la Clinica dermatologica** **dell'Università di Padova**

Scopo del saggio: lo scopo del test è quello di valutare la compatibilità cutanea di formulazioni cosmetiche destinate a venire a contatto con la cute umana. Le condizioni di utilizzo vengono esagerate (patch occlusivo fino a 24 ore) allo scopo di confermare che il prodotto non sia irritante nelle normali o ragionevolmente prevedibili condizioni d'uso. Il test può essere infatti eseguito solo dopo che un valutatore della sicurezza abbia attestato che non ci si aspetta alcun rischio significativo per i volontari nelle condizioni del metodo.

Nel caso di formulazioni ad elevato potenziale di rischio di irritazione per la cute, come ad esempio creme depilatorie, saponette solide, prodotti con ph basico etc, il laboratorio in accordo con il dermatologo, valuterà l'opportunità di utilizzare un test più blando quale la semi-occlusione oppure il test epicutaneo aperto.

È possibile eseguire il test su di un panel di volontari con pelle sensibile per poter supportare il claim "PER PELLI SENSIBILI".

Soggetti sottoposti all'esperimento:

- ❑ n° 20 soggetti, età: 18 – 60, sesso: M/F.
- ❑ criteri di selezione dei volontari:
 - Buono stato di salute
 - Non aver partecipato a prove analoghe nei due mesi precedenti
 - Anamnesi negativa per reazioni cutanee di tipo allergico
 - Assenza di patologie cutanee
 - Assenza di trattamenti farmacologici topici in atto
 - Esclusioni: donne in gravidanza e in fase di allattamento, minorenni
- ❑ a ciascun volontario viene consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il quale il volontario esprime il libero consenso al test e di non trovarsi in alcuna delle condizioni di esclusione dal test.

Schema di esecuzione del test: Dopo aver deterso la cute con alcol al 70%, i cerotti (Finn chambers on scanpor o CURATEST, e nel caso del semi-occlusivo F Webril cotton and Blenderm tape) vengono applicati nella regione paravertebrale, a livello scapolare, o sull'avambraccio e vengono lasciati in sito per 24 ore, ricordando al volontario di non lavare la zona per l'intera durata del test. Trascorso tale intervallo di tempo, il cerotto viene rimosso dal dermatologo, che provvede a ripulire le aree di applicazione da eventuali residui di prodotto. Dopo 15 minuti, tempo necessario affinché si spenga l'irritazione da cerotto, effettua una prima valutazione dell'eventuale irritazione assegnando un punteggio secondo una scala che va da 0 a 4 sia per l'eritema sia per l'edema. Dopo 24 ore dalla rimozione del cerotto, il dermatologo effettua una seconda valutazione dell'eritema e/o edema nelle medesime condizioni e modalità della prima lettura.

Nel test epicutaneo aperto le misurazioni saranno effettuate dopo 24 ore e dopo 48 ore dall'applicazione.

Espressione dei risultati: si definisce indice di irritazione medio la somma del punteggio di valutazione dell'eritema con quella dell'edema. I valori di indice di irritazione a 15 minuti e a 24 ore sono riportati nel rapporto sperimentale che completa la scheda relativa al volontario.

Analisi e valutazione risultati: per ciascun prodotto si esegue la media matematica degli indici di irritazione ottenuti nei 20 volontari reclutati per tale test. A seconda dell'indice ottenuto il prodotto viene classificato come *non irritante*, *leggermente irritante*, *moderatamente irritante* o *fortemente irritante*.

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — discussione dei risultati — firma del dermatologo.

17 . Valutazione del potenziale di irritazione e dell' "effetto reservoir" di saponi utilizzando l'occlusive patch-test seguito da TEWL

Scopo del saggio: scopo del presente studio è quello di verificare le possibili differenze del potenziale di irritazione e dell' *effetto resevoir* di prodotti cosmetici contenenti tensioattivi dopo l' applicazione in condizioni occlusive su cute umana intatta.

L'intrinseca capacità di indurre irritazione cutanea e l'effetto *resevoir* del tensioattivo vengono valutate usando la tecnica convenzionale del patch-test occlusivo seguita da misure strumentali non invasive (TEWL).

Soggetti sottoposti all'esperimento:

- ❑ n° 15-20 soggetti, età: 18 – 60, sesso: M/F
- ❑ criteri di selezione dei volontari:
 - Buono stato di salute
 - Assenza di patologie cutanee
 - Assenza di trattamenti farmacologici topici in atto
 - Anamnesi negativa per atopìa
 - Impegno a non usare altri prodotti topici nella zona da trattare durante la durata del test e di non applicare prodotti per il corpo nelle aree test per almeno 3 giorni prima dell'inizio del test
 - Esclusioni: donne in gravidanza e allattamento, minorenni
- ❑ a ciascun volontario viene consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il quale il volontario esprime il libero consenso al test e di non trovarsi in alcuna delle condizioni di esclusione dal test

Prodotti in esame: saponi liquidi

Disegno sperimentale: verrà utilizzato un controllo positivo rappresentato da SLS e un controllo negativo rappresentato da acqua distillata e il confronto nelle medesime condizioni dei prodotti in esame.

Schema di esecuzione del saggio:

I° STEP: VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI IRRITAZIONE:

- ❑ esecuzione del patch-test : applicazione nella parte volare dell'avambraccio di 20 µl di soluzione al 10% del prodotto in esame imbibita su dischetto di carta da filtro in occlusione su cerotto Finn Chambers per 24 ore. Dopo 24 ore il cerotto viene rimosso e le aree vengono risciacquate con acqua
- ❑ dopo 1 ora dalla rimozione del cerotto valutazione visiva delle irritazioni da parte del dermatologo utilizzando una scala di valutazione da 0 a 4 (**0: negativa**; **0.5 debolissimo** - eritema minimo o incerto e minima desquamazione; **1 debole** – debole eritema, leggero edema, leggera desquamazione e ruvidezza; **2 moderato** - grado moderato di eritema , edema, desquamazione e ruvidezza, **3 forte** - grado marcato dei eritema, edema, desquamazione e ruvidezza; **4 fortissimo/caustico** – come 3 ma con aree necrotiche)
- ❑ dopo 24 ore dalla rimozione del cerotto (48 ore dall'applicazione) valutazione visiva delle irritazioni da parte del dermatologo utilizzando la scala di valutazione da 0 a 4 sopraindicata e misurazione della TEWL in corrispondenza delle aree test e delle 2 di controllo

II° STEP: EFFETTO RESERVOIR:

- ❑ sull'avambraccio, applicazione da parte di un operatore dotato di finger cot di 50 µl di prodotto per 5 secondi, massaggiando delicatamente in tutta l'area. Tale area viene, quindi, risciacquata per 5 secondi con acqua e tamponata con carta assorbente
- ❑ Dopo 2 minuti, applicazione del cerotto in corrispondenza delle aree test che rimarrà in situ per 24 ore.
- ❑ Dopo 1 ora dalla rimozione del cerotto, valutazione visiva delle irritazioni da parte del dermatologo utilizzando la scala di valutazione da 0 a 4 sopraindicata
- ❑ dopo 24 ore dalla rimozione del cerotto (48 ore dall'applicazione) valutazione visiva delle irritazioni da parte del dermatologo utilizzando la scala di valutazione da 0 a 4 e misurazione della TEWL in corrispondenza delle aree test e delle 2 di controllo

Strumentazione: la misurazione viene eseguita con TEWAMETER TM 210. All'interno della sonda sono localizzati i sensori per il rilevamento dell'umidità relativa e della temperatura, l'elettronica di controllo ed il chip contenente i valori di taratura. La testa misuratrice è costituita da un cilindro cavo (diametro 10 mm, altezza 20mm) progettato per ridurre al minimo l'influenza dell'aria ed eventuali turbolenze.

Linee guida: "Assessment of water evaporation through skin (Trans Epidermal Water Loss according to Guidelines for TEWL measurement." Contact Dermatitis 1990; 22: 164-178

Analisi e valutazione risultati: trattamento statistico dei dati

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — statistiche — discussione dei risultati — firma del dermatologo.

18. Test di comedogenesi in vivo

Scopo del saggio: il test si propone di valutare se la quantità di sebo è aumentata in modo statisticamente significativo a seguito dell'applicazione ripetuta del prodotto cosmetico ed il numero medio di comedoni non è significativamente alterato ($p > 0.05$).

Soggetti sottoposti all'esperimento:

- n° 15 soggetti, età: 18 – 60, sesso: M/F
- criteri di selezione dei volontari:
 - Buono stato di salute
 - Assenza di patologie cutanee
 - Assenza di trattamenti farmacologici topici in atto
 - Anamnesi negativa per atopia
 - Impegno a non usare altri prodotti topici nella zona da trattare nelle 24h precedenti le misurazioni
 - Esclusioni: donne in gravidanza e allattamento, minorenni
- a ciascun volontario viene consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il quale il volontario esprime il libero consenso al test e di non trovarsi in alcuna delle condizioni di esclusione dal test

Disegno sperimentale: possono essere utilizzati uno o più dei seguenti disegni sperimentali

- attivo contro placebo
- controllo positivo o benchmark di mercato ad efficacia riconosciuta
- confronto tra prodotti con diversa formulazione

Schema di esecuzione del saggio: il prodotto viene applicato dai volontari per un periodo totale di 14 giorni, secondo istruzioni fornite dal committente.

I volontari vengono fatti acclimatare per 20 minuti nelle condizioni ambientali ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $50\% \pm 5\%$ U.R.). Le misurazioni strumentali vengono effettuate in quattro tempi: t0 (prima dell'applicazione), t1 dopo la prima applicazione, t7 dopo 1 settimana, t14 fine del test.

A tali valutazioni saranno associate le valutazioni visive dermatologiche mediante score cilico. Tali valutazioni saranno eseguite al T0 a T14gg (fine test).

Strumentazione: le misurazioni vengono effettuate con il Sebumeter SM810.

Analisi e valutazione risultati : trattamento statistico dei dati

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — statistiche — discussione dei risultati — firma.

19 . TEST OFTALMOLOGICO *in vivo* eseguito in collaborazione con un oculista

Scopo del saggio: lo scopo del test è quello di valutare la compatibilità oculare di formulazioni cosmetiche destinate a venire a contatto con gli occhi e zone limitrofe.

Nel mercato infatti, è presente un'ampia varietà di prodotti cosmetici destinati a venire a contatto con gli occhi e sono pubblicizzati ed etichettati come delicati ed adatti anche per pelli sensibili. Ma è effettivamente vero che tali prodotti non hanno alcuna intrinseca capacità di indurre irritazione a livello oculare?

Un utile conferma della compatibilità oculare di questa tipologia di prodotti cosmetici è l'esecuzione di un test in vivo sotto controllo oftalmologico.

Su richiesta del cliente, il test può essere eseguito anche in collaborazione con la clinica oculistica dell'Università di Padova.

Soggetti sottoposti all'esperimento:

- ❑ n° 15 soggetti, età: 18 – 60, sesso: M/F.
- ❑ criteri di selezione dei volontari:
 - Buono stato di salute
 - Non aver partecipato a prove analoghe nei due mesi precedenti
 - Anamnesi negativa per reazioni cutanee di tipo allergico
 - Assenza di patologie cutanee
 - Assenza di trattamenti farmacologici topici in atto
- ❑ Esclusioni: minorenni, soggetti in trattamento con anti-infiammatori steroidei e non steroidei

Prima dell'inizio del test ai partecipanti viene reso noto, tramite scheda informativa, lo scopo e la natura dello studio e i possibili rischi derivanti dalla partecipazione dello studio. A ciascun volontario viene altresì consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il libero consenso alla sperimentazione.

Schema di esecuzione del test: prima dell'inizio del test, l'oculista effettua una prima valutazione visiva dell'eventuale irritazione dell'area periorbitale, stabilendo così l'idoneità del soggetto a partecipare al test.

Dopo 1 giorno di applicazione del prodotto, l'oculista effettua una seconda valutazione dell'eritema, edema ed iperemia congiuntivale, assegnando un punteggio che va 0 a 4. Infine la terza e ultima valutazione viene eseguita, nelle medesime condizioni, dopo 30 giorni di applicazione quotidiana del prodotto.

Espressione dei risultati: si definisce indice di irritazione medio la somma del punteggio di valutazione dell'eritema con quella dell'edema e dell'iperemia congiuntivale. I valori di indice di irritazione a T0, T24 ore e T30 gg sono riportati nel rapporto sperimentale che completa la scheda relativa al volontario.

Analisi e valutazione risultati: per ciascun prodotto si esegue la media matematica degli indici di irritazione ottenuti nei 15 volontari reclutati per tale test. A seconda dell'indice ottenuto il prodotto viene classificato come *non irritante, leggermente irritante, moderatamente irritante o fortemente irritante*.

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — discussione dei risultati — firma dell'oculista.

20 . Valutazione in vitro del potenziale irritativo cutaneo utilizzando il metodo Dermal-Irritection

Scopo del saggio: il saggio Dermal Irritection® consiste in un test di approccio innovativo, che comprende l'impiego di matrici appositamente studiate e della strumentazione necessaria alla lettura ed alla elaborazione dei dati di risposta, attraverso un software dedicato che permette di determinare e predire il **potenziale irritativo dei prodotti cosmetici** nelle diverse forme in cui si possono presentare.

Il test Dermal irritation è destinato a selezione di materie prime non ancora testate, sviluppo di nuove formulazioni, estratti tessili e tensioattivi, etc.

Schema di esecuzione del test: l'impulso iniziale allo sviluppo del test è stata l'idea che un test in vitro potesse sostituire in modo affidabile il Patch test. Quando gli agenti irritanti sono posti sul derma, alterano la conformazione strutturale quaternaria delle proteine, producendo un'alterazione cutanea. Questo processo viene emulato in vitro con il test Dermal - irritation utilizzando una miscela di proteine e glicoproteine, sulla quale viene depositato il prodotto in analisi.

E' stato dimostrato che L'applicazione di agenti irritanti applicati alla matrice del test Irritection® producono effetti simili a quelli riscontrati in vivo. Gli effetti sulla interferenza nei confronti delle strutture proteiche che intervengono sia sulla cute in vivo che sulla matrice artificiale del Test Irritection®, sono correlabili alla aggressività dell'agente irritante. L'indice di irritazione può essere quantificato mediante misure spettrofotometriche di densità ottica attraverso uno spettrofotometro perfezionato per questo uso. Le misure di densità ottica secondo il protocollo Dermal Irritection® vengono effettuate a 450nm (OD450).

Interpretazione ed espressione dei risultati: in base alle correlazioni ricavate dai test effettuati in parallelo per definire le curve di calibrazione, è stato possibile determinare una correlazione diretta fra la scala di Patch test (HIE) e la scala determinata secondo il protocollo Irritection® come riportato di seguito:

Tab.1 Corrispondenza tra la scala Dermal Irritection® e quella di Irritazione Cutanea prevista (HIE)

Human Irritancy Equivalent (HIE)	Classificazione Irritazione Cutaneo
0.00-0.90	Non Irritant
0.90-1.20	Minimum Irritant
1.20-2.00	Mild Irritant
2.00-4.00	Irritant
>4.00	Severe Irritant

Metodo: Irritection Assay System Instruction Manual

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — protocollo —bibliografia risultati — discussione dei risultati — firma.

21 . Valutazione in vitro del potenziale irritativo oculare utilizzando il metodo Ocular Irritection

Scopo del saggio: il saggio Ocular Irritection® consiste in un test di approccio innovativo, che comprende l'impiego di matrici appositamente studiate e della strumentazione necessaria alla lettura ed alla elaborazione dei dati di risposta, attraverso un software dedicato che permette di determinare e predire il **potenziale irritativo oculare** dei prodotti cosmetici nelle diverse forme in cui si possono presentare.

Il test è maggiormente indicato per valutare il potenziale irritativo di prodotti per bambini e cosmetici ritenuti sicuri quali ad esempio contorno occhi, pelle secca, con smagliature, pelle irritata o lesa, prodotti a contatto con le mucose e prodotti per bambini di età inferiore ai 3 anni (baby shampoo, oli emollienti, creme per irritazione da pannolino, ecc).

Schema di esecuzione del test: l'impulso iniziale allo sviluppo del test è stata l'idea che un test in vitro potesse sostituire in modo affidabile il Draize test. Quando gli agenti irritanti vengono a contatto con l'occhio, questi alterano la conformazione strutturale delle proteine, producendo l'opacizzazione cornea. Questo processo viene emulato in vitro con il test ocular irritection utilizzando una miscela di proteine e glicoproteine, sulla quale viene depositato il prodotto in analisi.

L'indice di irritazione può essere quantificato mediante misure spettrofotometriche di densità ottica attraverso uno spettrofotometro perfezionato per questo uso. Le misure di densità ottica secondo il protocollo Irritection® vengono effettuate a 405nm (OD405).

Interpretazione ed espressione dei risultati: in base alle correlazioni ricavate dai test effettuati in parallelo per definire le curve di calibrazione, è stato possibile determinare una correlazione diretta fra la scala di Draize e la scala determinata secondo il protocollo Irritection® (Irritection Draize Equivalente, IDE), come riportato di seguito:

Tab.1 Il campione a seconda del MAX IDE (Irritection Draize Equivalent) viene classificato come:

Irritection Draize Equivalent (IDE)	Predicted Ocular Irritancy Classification
0.0 – 12.5	Minimal Irritant
12.5 – 30.0	Mild Irritant
30.0 – 51.0	Moderate Irritant
51.0 – 80.0	Severe Irritant

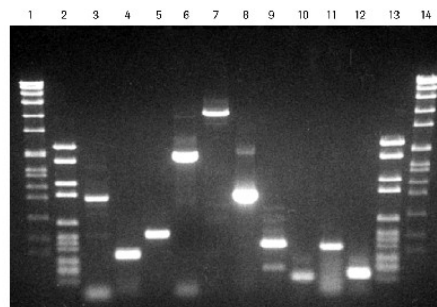
Metodo: Irritection Assay System Instruction Manual

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — protocollo —bibliografia risultati — discussione dei risultati — firma.

22 . Screening in-vitro di pro-sensibilizzazione cutanea

Scopo del test: testare l'induzione di sensibilizzazione allergica da parte di sostanze potenzialmente sensibilizzanti mediante la valutazione contemporanea dell'espressione di un numero anche elevato di geni diversi e quindi nella capacità di offrire informazioni più complete rispetto ad altri test disponibili sul mercato.

Cenni sul test: le cellule vengono trattate con diverse concentrazioni della sostanza di riferimento (Nickel Solfato) e delle sostanze da testare per 24-48 ore. I trattamenti vengono eseguiti sia nel medium di coltura fresco sia in una soluzione che mima la composizione del sudore (sudore sintetico). Al termine del trattamento le cellule vengono sottoposte a conteggi in camera Burkner con Trypan Blue, a saggio MTT e, infine, ad estrazione di RNA da sottoporre a Real Time PCR per valutare l'espressione dei geni CD80, CD86 e CD54 coinvolti nella sensibilizzazione cutanea.



Le concentrazioni delle sostanze da testare vengono scelte in base a dati ottenuti dalla letteratura relativa e dai saggi MTT precedentemente eseguiti con lo scopo di determinare una dose di sostanza da utilizzare nei trattamenti tale da non provocare una mortalità nel campione cellulare superiore al 25-30%.

I dati ottenuti con la sostanza oggetto di indagine vengono confrontati con quelli del Nickel Solfato allo scopo di fornire una valutazione per confronto del potere pro-sensibilizzante in termini di effetto (nullo, basso, medio, alto).

E' in studio la valutazione di altri geni coinvolti nella sensibilizzazione cutanea con lo scopo di offrire un saggio maggiormente predittivo.

L'espressione genica nella risposta immunitaria: i tipi di cellule riconducibili a monociti/macrofagi sembrano fortemente coinvolti nella risposta immunitaria dovuta all'esposizione con agenti sensibilizzanti.

Fungendo in particolare da APC (Antigen Presenting Cells), inducono la risposta immunitaria nelle cellule T attraverso l'esposizione dell'antigene legato alle molecole MHC II, antigene che viene riconosciuto dalle molecole TCR (T Cell Receptor) presenti sui linfociti T stessi. Questo legame non è però sufficiente, perché la risposta venga attivata. La costimolazione viene mediata dal legame tra proteine B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) presenti sulla membrana delle APC e CD28 che si trova sulla superficie dei linfociti T.

Le cellule che più frequentemente si comportano da APC sono i monociti/macrofagi. Da qui la scelta di utilizzare le linee cellulari di origine monocitica THP-1 (derivate da leucemia monolitica acuta) e derivate da linfoma isocistico U937 (linea cellulare promonocitica) per il primo sviluppo di un saggio sulla sensibilizzazione. Entrambe queste linee, ma specialmente quella THP-1, rispondono alla presenza della sostanza irritante aumentando il livello di espressione di CD80, CD86 e CD54.

23. Sniff test su deodoranti e anti-traspiranti

Scopo del saggio: il test consente di valutare in vivo l'efficacia di deodoranti o antitraspiranti.

Soggetti sottoposti all'esperimento:

- ❑ n° 20-25 soggetti, età: 18 – 60, sesso: M/F, possibilmente rappresentativi dei potenziali consumatori del prodotto.
- ❑ criteri di selezione dei volontari:
 - buono stato di salute
 - parità numerica tra maschi e femmine, selezionati tra coloro che svolgono un lavoro sedentario, o che richiede un'attività fisica.
 - Assenza di patologie cutanee.
 - Assenza di trattamenti farmacologici topici in atto.
 - Impegno a non usare altri prodotti topici nella zona da trattare nelle 24h precedenti le misurazioni.

Esclusioni: donne in gravidanza e allattamento, minorenni

- ❑ a ciascun volontario viene consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il quale il volontario esprime il libero consenso al test e di non trovarsi in alcuna delle condizioni di esclusione dal test
- ❑ Ai volontari viene richiesto di non utilizzare prodotti deodoranti per una settimana prima dell'inizio del test e di utilizzare per le abluzioni un sapone neutro non profumato da noi consegnato allo scopo

Disegno sperimentale: possono essere utilizzati uno o più dei seguenti disegni sperimentali

- ❑ trattato rispetto non trattato
- ❑ controllo positivo o benchmark di mercato ad efficacia riconosciuta
- ❑ confronto tra 2 prodotti con diversa formulazione

Giudici: panel esperto ed addestrato

L'efficacia del deodorante o antitraspirante viene valutata sulla base dell'intensità dell'odore di sudore percepita da un gruppo di "4 nasi" rappresentati da 2 uomini e 2 donne. I valutatori esperti sono considerati al pari di "strumenti umani" che devono, pertanto, essere "calibrati" mediante prodotti di riferimento e valutazione di prodotti leader del mercato.

Schema di esecuzione del saggio: a seconda della tipologia di prodotto e delle richieste del cliente, le valutazioni sensoriali possono essere eseguite dopo 8 ore, 24 ore, dopo 48 ore, ecc.

Su richiesta del cliente, sarà inoltre possibile distribuire anche un questionario di auto-valutazione al fine di ottenere un giudizio da parte di soggetti rappresentativi di potenziali consumatori sulle performance dei prodotti in esame.

Linee guida: si tratta di un metodo sviluppato internamente che trae le basi da guida EEMCO sullo SNIFF TEST (G.E. Piérard, P. Elsner, R. Marks, P. Masson, M. Paye, and the EEMCO Group, EEMCO Guidance for the Efficacy Assessment of Antiperspirants and Deodorants, Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology 2003;16:324-342), semplificandole però notevolmente.



Analisi e valutazione risultati: trattamento statistico dei dati.

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — obiettivo — rilevanza — protocollo — risultati — statistiche — discussione dei risultati — firma.

24 . *Analisi sensoriali su prodotti cosmetici*

Gli aspetti sensoriali quali la gradevolezza del profumo, la facilità nell'applicazione, le sensazioni più o meno piacevoli che vengono provate durante e/o dopo l'applicazione del prodotto, sono fondamentali per decretare il successo o la "debacle" dei prodotti cosmetici.

Questo sia per i prodotti che non vantano effetti particolari (es. bagnoschiuma, dopobagno etc) sia per quei prodotti che presentano una finalità specifica di **coadiuvanti** per problemi effettivi (quali ad esempio la cellulite, le rughe, la forfora oppure deodoranti). Ben difficilmente infatti i consumatori, che ormai stanno diventando sempre più scettici su quanto riportato dai messaggi pubblicitari in merito alle "performance" dei cosmetici, utilizzeranno prodotti che, ai sensi della vigente legislazione, "non hanno finalità terapeutiche e non possono vantare attività terapeutiche" se agli effetti vantati non si associano caratteristiche organolettiche piacevoli.

Se le proprietà specifiche vantate devono essere sostenute da test oggettivi, che ne dimostrino in modo inoppugnabile l'attendibilità, prendendo in considerazione l'aspettativa presunta di un "consumatore medio, normalmente informato e ragionevolmente attento e avveduto", e spesso necessitano della supervisione di un medico specialista, la fondamentale capacità di un cosmetico di creare nel consumatore una sensazione gradevole di benessere sia durante l'applicazione sia, possibilmente, nell'arco della giornata può essere valutata solo mediante test sensoriali. A titolo di esempio la decisione di lanciare o meno una linea di prodotti con una profumazione inusuale per un prodotto cosmetico, come quella di cacao o di liquirizia, può essere validamente supportata da un test sensoriale, possibilmente su un vasto numero di soggetti **estranei all'azienda**. È infatti estremamente probabile che i dipendenti, in particolare se hanno partecipato direttamente o indirettamente allo sviluppo del prodotto, non siano imparziali nelle loro valutazioni.

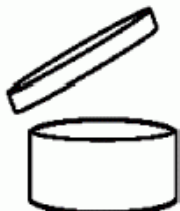
Per l'esecuzione delle analisi sensoriali vi sono essenzialmente due tipologie di test:

- **Panel esperto ed addestrato:** un gruppo composto da 20 o più valutatori esperti addestrati per essere il più sensibili possibile valuta le caratteristiche sensoriali del prodotto. I valutatori esperti sono considerati al pari di "strumenti umani" che devono pertanto essere calibrati mediante prodotti di riferimento e valutazione di prodotti leader del mercato. Tutti dati vengono poi sottoposti ad elaborazione e interpretazione statistica dei risultati.

- **Consumer test:** tale test prevede il reclutamento di un numero di volontari che va da 30 fino a 150, che utilizzano il prodotto e quindi compilano un questionario di auto-valutazione del cosmetico. Tale questionario viene precedentemente concordato con il Committente sulla base dei parametri di maggiore interesse (gradevolezza, profumazione, persistenza, facilità di applicazione, untuosità, ecc.). I dati verranno poi sottoposti ad elaborazione ed interpretazione statistica dei risultati.

25 . Valutazione del PAO (Period After Opening)

Cos'è il PAO? "Periodo dopo l'apertura" (PAO, Period After Opening) è definito come il tempo dopo l'apertura del prodotto cosmetico durante il quale questo può essere usato senza effetti nocivi per il consumatore. I parametri di stabilità su cui si fonda la determinazione del PAO sono quindi relativi alla sicurezza del consumatore e non alla "performance" tecnica del prodotto. Un cosmetico andrà considerato "aperto" quando il consumatore lo usa per la prima volta.



Pertanto, rispetto al ciclo di vita di un prodotto, il PAO si riferisce esclusivamente alla parte relativa alla sua fase di utilizzo da parte del consumatore.

La decisione finale sull'adeguatezza di un PAO, pur richiedendo opportuna documentazione, risulta a carico del responsabile dell'Azienda che immette il prodotto sul mercato.

L'indisponibilità di metodi scientifici ufficiali crea indubbiamente non poche difficoltà a chi deve assumersi la responsabilità di tale dichiarazione: infatti, non solo mancano protocolli che individuino la tipologia di analisi più idonea per i diversi prodotti, ma addirittura mancano riferimenti bibliografici riconosciuti riguardo l'effettiva corrispondenza tra lo stress artificialmente imposto al prodotto in idonee camere climatiche (es: $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$) e il reale invecchiamento del prodotto.

In mancanza, quindi, di una normativa che stabilisca le modalità e la durata di questo tipo di prove, sarà necessario affidarsi alla conoscenza delle caratteristiche del prodotto, applicando criteri più o meno restrittivi a seconda del maggiore o minore rischio di contaminazioni e/o degradazioni chimiche.

Chi deve determinare il PAO si dovrà basare su dati di tipo quantitativo e/o qualitativo, facendo anche ricorso all'esperienza personale ed aziendale.

La valutazione deve tenere in considerazione la complessità dell'insieme dei prodotti cosmetici e le normali o ragionevolmente prevedibili condizioni in cui i consumatori li utilizzano.

In generale, i principali fattori che possono influenzare la stabilità chimica e fisica sono:

1. Suscettibilità a contaminazione microbica. Sotto questo aspetto la stabilità dopo l'apertura è principalmente dovuta al perdurare dell'efficacia del sistema conservante dopo l'esposizione all'ambiente esterno, e il rischio di contaminazione del prodotto è soprattutto correlato al contatto fisico con il consumatore. Alcuni prodotti per loro natura non sono esposti alla contaminazione batterica per cui è inutile indagare sulla stabilità microbiologica ad es. prodotti in confezioni che assicurano protezione specifica al contenuto ed impediscono qualsiasi contaminazione (aerosol, confezioni che evitano il contatto del prodotto con l'esterno) e prodotti le cui caratteristiche intrinseche li rendono ostili alla crescita di microrganismi (prodotti con alto contenuto di alcool, con bassa presenza di "acqua libera", con pH superiori a 8 o inferiori a 4,5). Una tipologia di prodotti per i quali non è necessaria la determinazione del PAO è ovviamente, quella dei monouso.
2. Modalità e destinazione d'uso (es. verrà utilizzato da consumatori privati o da professionisti? In quanto tempo verrà ragionevolmente consumato? È un prodotto a risciacquo oppure no? Quante volte al giorno e con che modalità viene applicato?)

Un altro aspetto da valutare è la tempistica di esecuzione dei controlli: una volta stabilito la durata ipotetica del prodotto dopo apertura (es. 6 mesi) e la corrispondenza più opportuna tra invecchiamento accelerato ed effettivo (es. 1 mese = 6 mesi), infatti, sarà più opportuno fare un unico controllo a scadenza, o eseguire più controlli scaglionati (es. una volta la settimana)? Anche in questo caso l'approccio migliore dipende strettamente dalle caratteristiche del campione: ovviamente più queste caratteristiche sono tali da rendere il prodotto "a rischio" e maggiore è l'opportunità di eseguire il controllo a intervalli regolari. Mentre, ad esempio, per un prodotto che venga a contatto tutti i giorni con l'esterno e con le mani dell'utilizzatore sarà essenziale un test del tipo "a insulto ripetuto", con controlli da eseguire ad intervalli di una settimana l'uno dall'altro, per un prodotto che sia confezionato in un contenitore con erogatore "pump", e che venga utilizzato una volta la settimana (es. uno scrub) potrà invece essere sufficiente un challenge all'ipotetica scadenza.

Protocolli indicativi: i protocolli suggeriti vanno intesi come proposte di massima, da adattare di volta in volta a seconda delle specifiche caratteristiche del prodotto.

Si presuppone ovviamente che, poiché la valutazione della sicurezza di un prodotto cosmetico è un obbligo previsto da tempo dalla vigente legislazione, siano state eseguite tutte le analisi del caso per ottemperarvi, e che di conseguenza l'unica incognita possa essere non la sicurezza del prodotto in sé, ma quella dello stesso sottoposto a "stress d'uso".

Tutte le analisi proposte si intendono eseguite dopo stazionamento in camera termostata a 40 °C con umidità pari a 75% con simulazione quotidiana di utilizzo quotidiana da parte di personale esperto. La durata della permanenza e la frequenza nell'esecuzione dei controlli andrà definita di volta in volta.

26 . Valutazione dell'efficacia dei prodotti per combattere gli inestetismi cutanei

Scopo del test : valutazione in vivo prima e dopo il trattamento con cosmetici studiati per prendersi cura della pelle:

- antirughe /antiage
- prodotti per ridurre le borse sotto gli occhi
- per aggiungere turgore alle labbra
- per combattere i pori dilatati
- inestetismi della cellulite

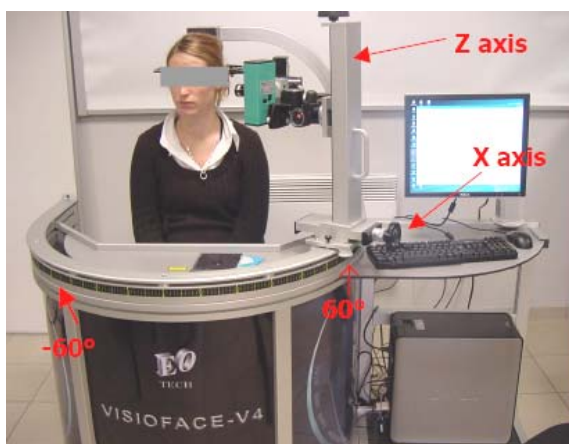
Soggetti sottoposti all'esperimento:

- ❑ n° 20-30 soggetti, età: 18 – 60, sesso: M/F rappresentativi dei potenziali consumatori
- ❑ criteri di selezione dei volontari:
 - Buono stato di salute
 - Assenza di patologie cutanee
 - Assenza di trattamenti farmacologici topici in atto
 - Anamnesi negativa per atopia
 - Impegno a non usare altri prodotti topici nella zona da trattare nelle 24h precedenti le misurazioni
 - Esclusioni: donne in gravidanza e allattamento, minorenni
- ❑ a ciascun volontario viene consegnato un modulo compilando e sottoscrivendo il quale il volontario esprime il libero consenso al test e di non trovarsi in alcuna delle condizioni di esclusione dal test

Disegno sperimentale: possono essere utilizzati uno o più dei seguenti disegni sperimentali

- ❑ confronto tra prima, durante e dopo il trattamento
- ❑ controllo positivo o benchmark di mercato ad efficacia riconosciuta
- ❑ confronto tra prodotti con diversa formulazione

Strumentazione : **DERMATOP BLUE** della ditta EOTECH che utilizza la tecnologia Breuckmann. Si tratta di



uno scanner cutaneo di ultima generazione in grado di visualizzare la struttura cutanea confrontando i risultati ottenuti valutando i soggetti al tempo 0 e dopo un tempo definito di utilizzo dei prodotti da testare.

Serve a misurare, con estrema precisione, le performances dei prodotti cosmetici destinati a ridurre gli inestetismi cutanei: rughe, borse sotto gli occhi, pori dilatati, tessuti che cedono, cellulite, labbra troppo sottili. Un sistema di sensori permette di individuare con precisione la zona da valutare e di eseguire una scansione della cute, che rileverà con estrema precisione la posizione, l'area e il volume di rilievi e infossature, sia di dimensioni minime (pori) che macroscopiche (la "cute a materasso" dovuta alla cellulite. Ciò viene fatto prima di iniziare il trattamento e alla fine di

questo, e tutte le differenze vengono registrate, fotografate e valutate statisticamente.

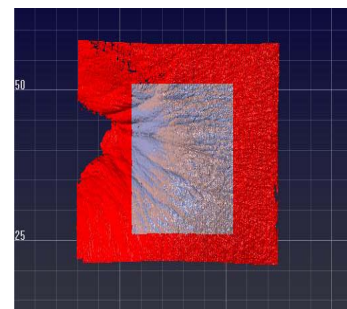
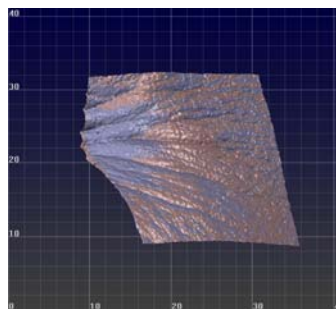
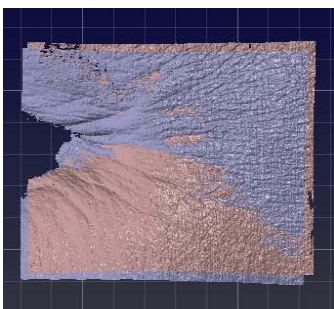
CHELAB®

Alle misurazioni con il dermatop sarà possibile verificare anche :

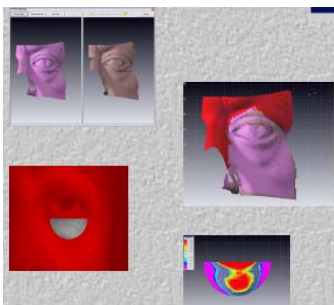
1. **ELASTICITA'** : ovvero l'aumento delle proprietà tensili della cute in seguito al trattamento cosmetico applicato in dosi ripetute (1 mese di trattamento). Le proprietà tensili, ovvero elasticità biologica e recupero elastico, vengono misurate con CUTOMETER SEM 575 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Germany).
2. **IDRATAZIONE** : aumento dell'idratazione cutanea in seguito al trattamento cosmetico applicato in dosi ripetute (1 mese di trattamento). L'idratazione viene misurata mediante CORNEOMETER CM 825

Ecco alcuni esempi di immagini rilevate con il **DERMATOP BLUE** :

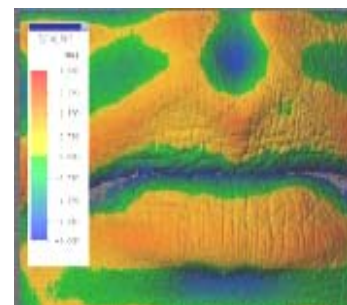
Rughe:



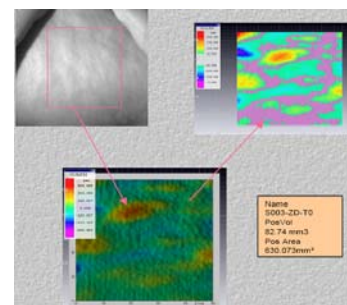
Borse sotto gli occhi:



Labbra:



Cellulite:



Analisi e valutazione risultati: trattamento statistico dei dati

Documentazione: viene redatta una relazione così strutturata: identificazione — protocollo — bibliografia risultati — immagini — discussione dei risultati — firma.

27 . Test di irritazione cutanea

Modelli di cute umana per test di irritazione cutanea (EPISKIN® e EPIDERM®) secondo metodo B.46 dell'allegato a 440/2008/EC (761/2009/EC), linee guida OECD 431

28 . Test di irritazione oculare

Modelli di tessuto corneale umano per test di irritazione oculare

29 . Tossicità

Citotossicità secondo UNI EN ISO 10993-5:2000

30 . Mutagenesi

Test di Ames o reversione genica su batteri secondo linee guida OECD 471
Micronucleus in vitro test secondo linee guida OECD 487