



Via Puzzone snc - 87040 Marano Principato (CS)
Tel. 0984 641129
Email: masdernatura@gmail.com
Web site: www.laboratoriomasder.com

- Realizzazione cosmetici per conto di terzi
- Ricerca scientifica su materie prime per uso cosmetico
- Valutazione della sicurezza dei prodotti cosmetici
- Valutazione di efficacia del cosmetico finito
- Analisi su materie prime cosmetiche
- Legislazione Cosmetica
- Regolamento 1223/2009
- Persona Responsabile
- Product Information File (PIF)
- Buone pratiche di fabbricazione (GMP)

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI UNA CREMA O/A AD ATTIVITA ANTIRUGHE

Comitato Tecnico Scientifico: LABORATORIO MASDER RESEARCH AREA

Coordinatore Scientifico: Sergio Mazzulla

Controllo Qualità: Rosaria Sansone, Annalisa Scaglione, Federica Clausi.

Responsabile Stesura grafica: Mario Giordano, Marco De Seta

Responsabile Tecnico: Adelaide Anile, Dante Anile

Report: AP0317- Prodotto testato: **Apollinea - Crema viso antirughe**

COMMITTENTE: Apollinea Lab s.r.l., con sede in Lauria Contrada Galdo snc iscritta al Registro delle Imprese di Potenza n° 01998500761 Partita Iva 01998500761

PREMESSA

Un moderno prodotto anti-age deve possedere diverse funzionalità, idratare la pelle, renderla più elastica, ridurre la visibilità delle rughe sottili e profonde e a questo si deve aggiungere ovviamente una formula cosmetica gradevole e attrattiva e l'assenza di effetti collaterali di ogni tipo. La comunità scientifica si vede impegnata ad approfondire e studiare le potenzialità delle materie prime vegetali, visto il crescente interesse nel campo non solo terapeutico ma anche cosmetico. L'obiettivo che si prefigge il seguente studio, è quello di voler valutare la funzione elasticizzante cutanea, l'idratazione e la riduzione delle rughe cutanee. Il preparato (emulsione o/a) si avvale di due materie prime naturali, quali il siero di latte d'asina e la bava di lumaca. La formulazione è arricchita dal burro di Karité e dall'olio di mandorle dolci. Il latte d'asina contiene naturalmente sostanze che donano all'epidermide un bilanciato nutrimento e mantengono il giusto equilibrio idrolipidico della cute rendendo la pelle morbida, liscia ed elastica. Questo pool di sostanze presenta peculiari caratteristiche che possono essere sfruttate per prevenire e contrastare il processo di invecchiamento cutaneo, in quanto favoriscono un'azione ristrutturante e supportano un aumento dell'idratazione, donando tono e turgore alla pelle. Queste stimolano inoltre l'attività metabolica dei fibroblasti favorendo il processo di produzione endogena della trama di collagene che costituisce l'impalcatura di sostegno del derma e inoltre forniscono un'azione antiossidante. Il vero punto di forza del latte d'asina è il suo profilo biochimico. Tra le caratteristiche più importanti si evidenzia il tasso di lattosio e il profilo proteico. La frazione proteica totale del latte d'asina è 1,74%, tale componente proteica è ricca di aminoacidi essenziali che ristrutturano e

riparano eventuali danni nel processo di invecchiamento e di sieroproteine ad altissimo valore biologico. Infatti, il complesso lattoalbumina, lattoglobulina e sieroproteine totali, formano sulla superficie della pelle un sottile film che a causa dell'evaporazione dell'acqua si ritrae esercitando un effetto tensore sulla pelle.

L'altro interessante principio funzionale vegetale è la bava di lumaca che ha una composizione unica e complessa di sostanze attive. Tra i principali componenti, l'allantoina, l'acido glicolico, il collagene, vitamine e minerali. Il collagene è una proteina strutturale di sostegno del derma. L'allantoina si è dimostrata attiva come cicatrizzante e ammorbidente, sollecita la proliferazione cellulare promuovendo la cheratolisi, l'aumento del contenuto di acqua della matrice extracellulare e il distacco dei corneociti. L'acido glicolico ha una duplice azione: diminuisce la forza di coesione tra i corneociti, con assottigliamento dello strato corneo e aumenta la quantità di collagene e dei glucosamminoglicani (GAG) del derma. Grazie a questo duplice effetto allontana le cellule morte dallo strato più esterno dell'epidermide e facilita l'inserimento nella cute di altri principi attivi. Il collagene è una proteina strutturale di sostegno.

Nella formulazione della crema Apollinea particolare attenzione è stata posta nella scelta della componente lipidica, utilizzata al fine di donare proprietà emollienti al prodotto. Apollinea contiene oli e burri vegetali tra cui il burro di karité e l'olio di mandorle dolci. Il burro di karité è molto apprezzato perché possiede un'elevata frazione di trigliceridi, ed è utilizzato nello skin care per le sue proprietà emollienti, protettive ed idratanti. La frazione lipidica del Karité proposta come burro in toto è apprezzata per il suo contenuto in insaponificabili, preziosa risorsa di sostanze attive. L'olio di mandorle dolci ha un elevato contenuto di acidi grassi, la maggior parte costituita da acidi grassi insaturi. L'alto contenuto di acido oleico rende l'olio di mandorle più resistente all'ossidazione rispetto ad altri oli. Gli acidi grassi polinsaturi contribuiscono alla funzione barriera dell'epidermide e all'omeostasi della cute.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio di seguito descritto ha avuto il fine di valutare l'efficacia antirughe (riduzione della rugosità della pelle del viso) di un trattamento dermo-cosmetico, che prevede la distribuzione fino a completo assorbimento sui distretti anatomici della pelle del viso sottoposti a valutazione di efficacia, circa 2 (due grammi) della emulsione O/A Apollinea – crema viso antirughe.

Allo scopo è stato eseguito uno studio su 12 (dodici) soggetti sani: 8 (otto) di sesso femminile, e 4 (quattro) di sesso maschile, la cui pelle è caratterizzata dalla presenza di rughe cutanee. A distanza di 2 (due) ore e 40 giorni dall'uso, l'efficacia del prodotto è stata valutata prima, e dopo il trattamento mediante tecniche non invasive in grado di quantificare la funzione elasticizzante cutanea, l'idratazione e la riduzione delle rughe,

Lo studio si prefigge di indagare l'efficacia "in vivo" della formulazione Apollinea – crema viso antirughe per l'effetto antirughe a breve termine (dopo 2 ore) e a lungo termine dopo 40 giorni.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Lo studio è condotto in accordo con la dichiarazione di Helsinki (Principi Etici per ricerche Mediche che coinvolgono soggetti umani). IL prodotto dermo-cosmetico sottoposto allo studio è stato formulato senza utilizzare sostanze di cui è vietato l'uso in prodotti cosmetici e d'igiene corporale (legislazione CE); gli agenti conservanti introdotti nella formula del prodotto, figurano nella lista positiva pubblicata dalla CE e sono utilizzati a una concentrazione conforme all'uso previsto da questa legge. Per tutte le sostanze di cui c'è un limite di concentrazione sono rispettati i limiti e le avvertenze riportati nei rispettivi allegati nella Normative CEE 76/768, 1223/2009 e successive mediche. Dodici volontari sani, fra i 35 e i 67 anni di età sono stati selezionati secondo i seguenti criteri di inclusione:

- Soggetti in buono stato di salute generale;
- Assenza di patologie cutanee;
- Soggetti che presentino rughe e lassità cutanea nelle zone periorculari;
- Soggetti che non presentino lesioni pigmentarie o altre lesioni sulla sede d'interesse che possano interferire con l'esecuzione dello studio; soggetti che non presentino in anamnesi storie d'ipersensibilità nei confronti dei comuni componenti presenti nelle formulazioni cosmetiche;
- Non essere in stato di gravidanza o in allattamento;
- Soggetti che accettino di non far uso di altri prodotti di altri prodotti cosmetici per tutta la durata del test nelle zone cutanee soggette a valutazione;
- Soggetti che acconsentano a firmare il consenso informato; E i

seguenti criteri di esclusione:

- Soggetti non inclusi nei criteri menzionati;
- Eventuale trattamento farmacologico che potrebbe interferire con lo studio;
- Partecipazione a uno studio simile negli ultimi 60 giorni;
- Soggetti con allergie a qualche componente del prodotto.

DISEGNO DELLO STUDIO

Il prodotto è applicato dallo sperimentatore mediante massaggio fino a completo assorbimento sulle zone anatomiche del viso soggette a valutazione, il controllo è rappresentato dalle misure di elasticità cutanea, idratazione, rugosità complessiva delle zone anatomiche prima dell'applicazione del prodotto (Tempo 0). Le misure di elasticità cutanea, idratazione e di rugosità sono state eseguite ai tempi 0, 2 ore e 40 giorni. Lo Sperimentatore al primo giorno ha provveduto ad istruire i soggetti partecipanti allo studio circa la modalità delle successive applicazione della emulsione.

In particolare:

- 1) La pelle del viso deve essere accuratamente deteresa per rimuovere i residui di prodotti cosmetici eventualmente presenti;
- 2) L'emulsione è applicata fino a completo assorbimento, in particolare sulle zone del viso dove si evidenziano la presenza di rughe cutanee, eseguendo un leggero massaggio fino a completo assorbimento del prodotto.
- 3) Lo sperimentatore al primo giorno ha effettuato la valutazione di elasticità cutanea, idratazione e di rugosità, intesa a attestare l'effetto antirughe a breve termine (dopo 2 ore).

1. VALUTAZIONE DEL PARAMETROELASTICITA'

La misurazione della elasticità cutanea, è stata eseguita mediante la strumentazione “Soft Plus” dell’azienda Callegari S.p.A Parma (Italia), il quale è munito di sonde per misurazione singole.



Fig.1 Sonda elasticità

Principio di misura

La valutazione dell’elasticità cutanea consente di monitorare le proprietà viscoelastiche della cute rispetto alla deformazione immediata e alla sua capacità di tornare alla posizione originaria. Tramite misurazione della deformazione della pelle sotto applicazione di una pressione negativa generata dalla sonda, è possibile determinare l’indice di elasticità della pelle.

1.1 MISURA DELLA ELASTICITA'

- 1) Si posiziona la sonda sulla cute nelle zone di interesse;
- 2) Si assicura che la porzione di superficie cutanea scelta sia pressoché piana e che la sonda aderisca in maniera uniforme alla superficie;
- 3) Si preme il tasto di attivazione, in modo da avviare la pompa di aspirazione;
- 4) Si regge saldamente la sonda in posizione;
- 5) Si attende il completamento della misura;
- 6) Si archivia il risultato.

1.2. VALUTAZIONE DEL PARAMETRO IDRATAZIONE

La misurazione della idratazione cutanea, è stata eseguita mediante sonda specifica per singole misurazioni, in dotazione con la strumentazione “Soft Plus” dell’azienda Callegari S.p.A Parma (Italia).

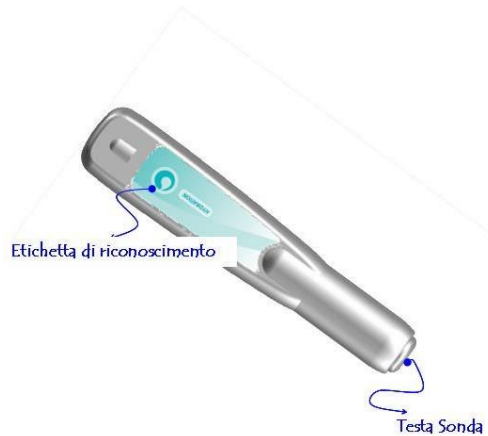


Fig.2. Sonda idratazione

Principio di misura

misura dell'idratazione tramite sensore capacitivo (costante dielettrica della pelle e dei tessuti sottocutanei).

Procedura di misurazione

1.3 Misura idratazione cutanea

- 1) Si assicura che la porzione di superficie cutanea scelta sia pressoché piana e che la sonda aderisca in maniera uniforme alla superficie;
- 2) Si posiziona la sonda sulla cute nella zona di interesse;
- 3) Si esercita una pressione adeguata a far rientrare la punta all'interno del corpo sonda;
- 4) La misura inizia automaticamente al contatto della sonda con la pelle;
- 5) Si attende il completamento della misura;
- 6) Si archivia il risultato.

1.4 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA ANTIRUGHE MEDIANTE ANALISI D'IMMAGINE

La valutazione delle zone anatomiche del viso caratterizzate dalla presenza di rughe cutanee, è stata ottenuta attraverso l'utilizzo della strumentazione "Soft Plus" dell'azienda Callegari S.p.A Parma (Italia), il quale è munito di microcamera che consente di ottenere una adeguata digitalizzazione delle zone anatomiche sottoposte a valutazione e software idonei allo scopo.

La micro-camera (fig.2), dotata di lente 100 x e con oculare X12, munito di distanziatore non regolabile in modo da assicurare l'acquisizione di immagini alle stesse condizioni sperimentali. Inoltre la corona di led bianchi consente di creare la giusta illuminazione.



X12 Illuminazione verticale (contatto parziale)

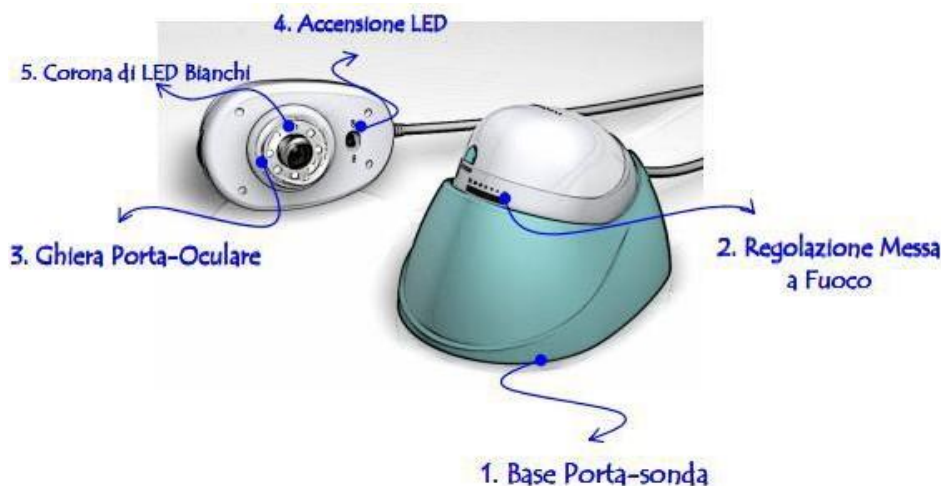


Fig.3. Microcamera con oculare X12

Acquisizione di immagini con microcamera:

- Si attivano i led della microcamera;
 - Si appoggia l'oculare direttamente sulla pelle;
 - Si attende che la microcamera regola automaticamente la luminosità dell'immagine;
 - Si provvede a mettere a fuoco utilizzando la rotella sulla microcamera fino che sullo schermo l'immagine non risulterà nitida;
 - Si assicura che la microcamera rimanga in posizione evitando per quanto possibile movimenti che potrebbero sfocare l'acquisizione;
 - Si acquisisce l'immagine premendo il tasto "Cattura immagine" sul monitor dello strumento.
- Il software consente di ottenere informazioni sull'altezza (H) e l'ampiezza (W), delle rughe soggette a valutazione.

Per confermare il dato sperimentale ottenuto si è proceduto ad acquisire ulteriori immagini, mediante utilizzo di una camera digitale ad elevata risoluzione, delle medesime zone anatomiche del viso, soggette ad esame e, sottoposte a analisi di immagine.

Tale valutazione è stata eseguita con il programma **ImageJ**, un software open source, programmato in JAVA. ImageJ consente di visualizzare, modificare, analizzare, processare, salvare e stampare immagini a 8-bit, 16-bit e 32-bit. I formati supportati sono TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS e "raw".

Per la valutazione oggettiva, Image J, tra le sue varie utilità, consente di eseguire la misurazione dei pixel in scala di grigi. Il programma permette di individuare le stesse selezioni, prima e dopo il trattamento, consentendo di analizzare le selezioni di medesime porzioni cutanee restituendo tra le altre, misure in pixel sul profilo rugoso in esame: area, altezza e integrale di densità che equivale al prodotto della media dei valori di grigio (mean) per le aree.

Su tutti i soggetti partecipanti alla valutazione sono state analizzate le rughe cutanee prima del trattamento (T=0 giorni), (T=2 ore) e (T=40 giorni). L'analisi dopo 2 (due ore) ha l'obiettivo di verificare una efficacia antirughe a breve termine.

ANALISI STATISTICA

Per l'interpretazione statistica dei risultati ottenuti dalle prove di efficacia, è stata eseguita l'analisi della varianza. L'analisi della varianza è utilizzata per testare le differenze tra medie campionarie, e per fare questo si prendono in considerazione le rispettive varianze. Il principio alla base di questo test è di stabilire se due o più medie campionarie possono derivare da popolazioni che hanno la stessa media parametrica. Quando le medie sono solamente due è indifferente usare questo test o il "t-test", mentre si deve necessariamente utilizzare l'ANOVA quando le medie sono più di due, o quando vogliamo suddividere la variabile di raggruppamento in più variabili per eliminare eventuali fonti di variazione oltre a quella prodotta dal fattore di cui vogliamo valutarne l'effetto. Le misure di elasticità cutanea, idratazione e il profilo rugoso sono sottoposte al test ANOVA a 1 via, in quanto, si esegue il confronto tra i tempi 0, 2 ore e 40 giorni.

I test risulteranno:

n.s. non significativo se $p > 0.05$;

* significativo se $p < 0,05$;

** molto significativo se $p < 0.01$;

*** estremamente significativo se $p < 0.0001$.

RISULTATI E DISCUSSIONI

2.1 Parametro elasticità cutanea

Il parametro elasticità cutanea, indica le proprietà viscoelastiche della cute rispetto alla deformazione immediata e alla sua capacità di tornare alla posizione originaria nota come la parte elastica della pelle. Tale parametro, è indice della facilità con cui si può deformare la pelle.

Lo strumento, ci consente di monitorare l'indice di elasticità della pelle, in seguito alla deformazione della stessa, sotto applicazione di vuoto.

Risultato analisi elasticità cutanea

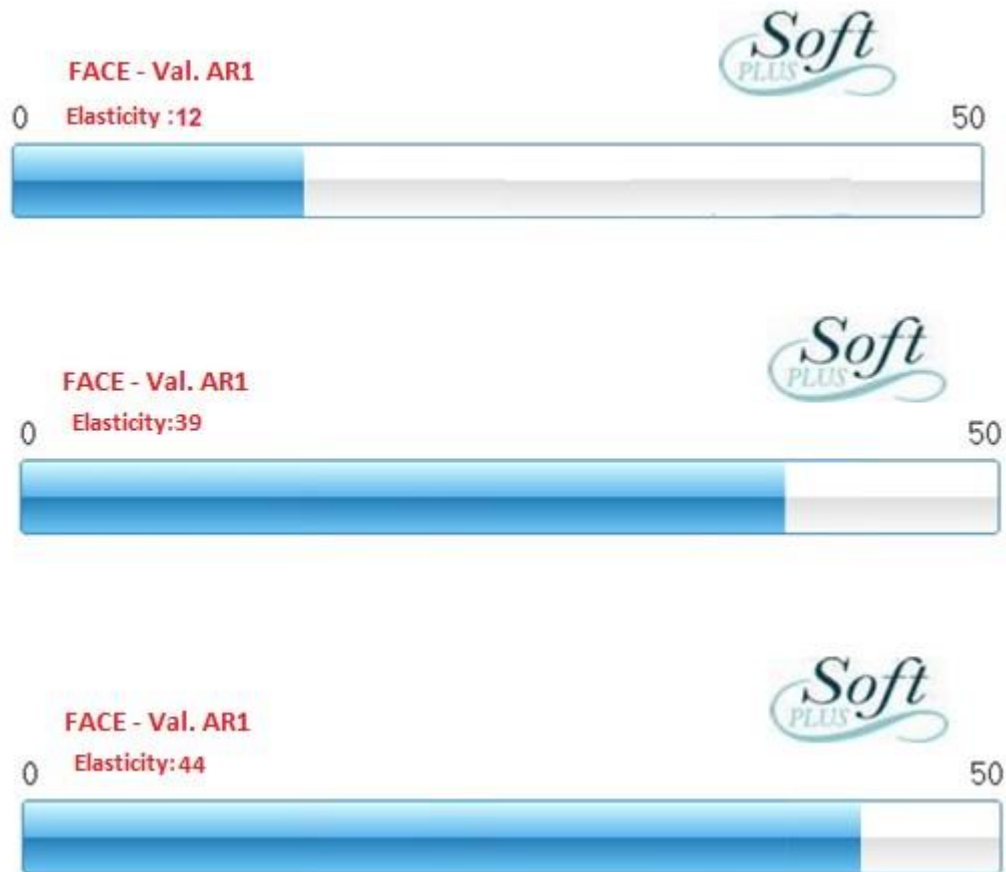


FIG.4. Tipica rappresentazione del parametro elasticità, generato dalla sonda e dal software prima e dopo il trattamento. La misura di elasticità è espressa come scala arbitraria (0 a 50).

Misure del parametro elasticità prima e dopo il trattamento

| ELASTICITÀ A' | T=0 | T=2 hr | T=40 day |
|------------------|-------------------|----------------------|-------------|
| AR1 | 12 | 39 | 44 |
| AR2 | 29 | 33 | 39 |
| AR3 | 22 | 33 | 45 |
| AR4 | 42 | 42 | 37 |
| AR5 | 45 | 48 | 50 |
| AR6 | 38 | 43 | 44 |
| AR7 | 29 | 39 | 43 |
| AR8 | 17 | 24 | 36 |
| AR9 | 12 | 39 | 42 |
| AR10 | 24 | 28 | 44 |
| AR11 | 29 | 34 | 42 |
| AR12 | 23 | 49 | 50 |
| Media | 28,7 5 | 37,416 67 | 43 |

Tab.1. valori ottenuti dall'analisi di elasticità cutanea ai tempi 0, 2 ore e 40 giorni su 12 volontari

ANALISI STATISTICA PARAMETRO ELASTICITÀ CUTANEA (One-Way ANOVA)

| source | sum of squares SS | degrees of freedom vv | mean square MS | F statistic | p-value |
|-----------|-------------------|-----------------------|----------------|-------------|---------|
| Treatment | 1,237.3889 | 2 | 618.6944 | 10.6606 | 0.0003 |
| error | 1,915.1667 | 33 | 58.0354 | | |
| total | 3,152.5556 | 35 | | | |

Tab.2. Skin elasticity -One-way ANOVA – 3 independent treatments (T=0, T=2hr, T= 40day).

| Treatments pair | Bonferroni and Holm π - statistic | Bonferroni p-value | Bonferroni inference | Holm p-value | Holm inference |
|-----------------|---------------------------------------|--------------------|----------------------|--------------|----------------|
| T=0 vs T=2hr | 2.7866 | 0.0175235 | * $p < 0.05$ | 0.0087618 | ** $p < 0.01$ |
| T=0 vs T=40 day | 4.5819 | 0.0001258 | ** $p < 0.01$ | 0.0001258 | ** $p < 0.01$ |

Tab.3. Elasticity skin -Bonferroni and Holm results: only pairs relative to T=0 simultaneously compared.

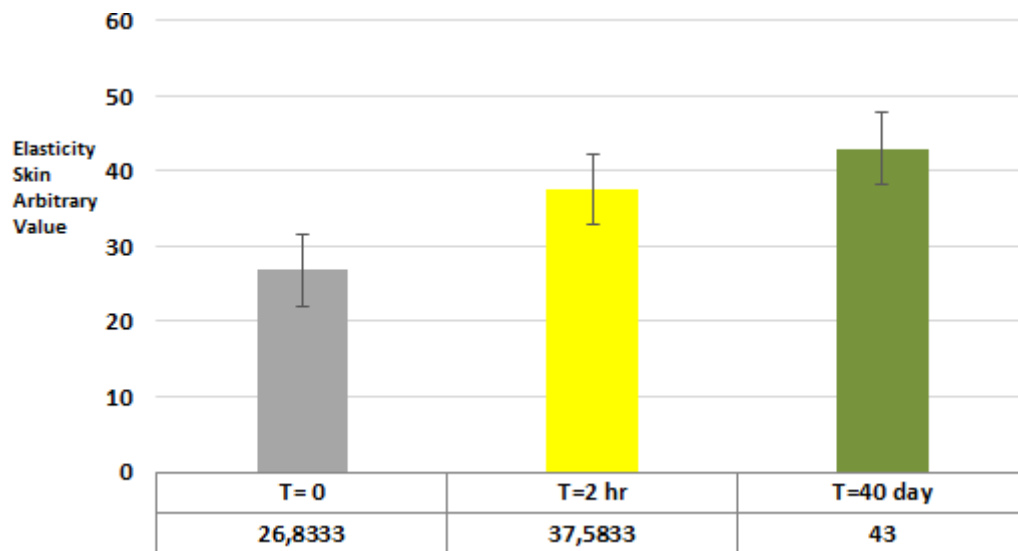


Fig.5. Istogramma elasticità cutanea: Il parametro è significativo T=2hr e T=40 day vs T=0, ($p < 0.05$)

Aumento della elasticità cutanea

Dopo 2 ore = 37,41%
Dopo 40gg = 47,43%

2.2. Parametro idratazione cutanea

La misura dell'idratazione tramite sensore capacitivo è in grado di monitorare la costante dielettrica della pelle e dei tessuti sottocutanei. Tale misura è direttamente proporzionale alla quantità di acqua nei tessuti.

Risultato analisi idratazione cutanea



Fig.6. Tipica rappresentazione del parametro idratazione, generato dalla sonda e dal software prima e dopo il trattamento. La misura di idratazione è espressa come scala arbitraria (0 a 100).

Misure del parametro idratazione prima e dopo il trattamento

| SOGGETTI TRATTATI | Tempo = 0gg | Tempo= 2 ore | Tempo =40gg |
|-------------------|---------------|---------------|--------------|
| Val AR1 | 36 | 48 | 60 |
| Val AR2 | 50 | 58 | 68 |
| Val AR3 | 36 | 56 | 72 |
| Val AR4 | 29 | 44 | 71 |
| Val AR5 | 44 | 52 | 60 |
| Val AR6 | 14 | 30 | 47 |
| Val AR7 | 25 | 30 | 42 |
| Val AR8 | 48 | 71 | 82 |
| Val AR9 | 44 | 62 | 75 |
| Val AR10 | 33 | 44 | 53 |
| Val AR11 | 42 | 47 | 71 |
| VAL AR 12 | 26 | 54 | 70 |
| MEDIA | 38,083 | 49,667 | 64,25 |

Tab.4. Misura del parametro idratazione cutanea prima e dopo il trattamento

| source | sum of squares SS | degrees of freedom vv | mean square MS | F statistic | p-value |
|-----------|-------------------|-----------------------|----------------|-------------|------------|
| treatment | 4,931.1667 | 2 | 2,465.5833 | 18.3342 | 4.4196e-06 |
| error | 4,437.8333 | 33 | 134.4798 | | |
| total | 9,369.0000 | 35 | | | |

Tab.5. Hydrating skin-One-way ANOVA–3 independent treatments (T=0, T=2hr, T= 40day).

| treatment pair | Bonferroni and Holm TT-statistic | Bonferroni p-value | Bonferroni inference | Holm p-value | Holm inference |
|-----------------|----------------------------------|--------------------|----------------------|--------------|----------------|
| T=0 vs T=2hr | 2.9748 | 0.0108974 | * p<0.05 | 0.0054487 | ** p<0.01 |
| T=0 vs T=40 day | 6.0551 | 1.6406e-06 | ** p<0.01 | 1.6406e-06 | ** p<0.01 |

Tab.6. Hydrating skin-Bonferroni and Holm results: only pairs relative to T=0 simultaneously compared

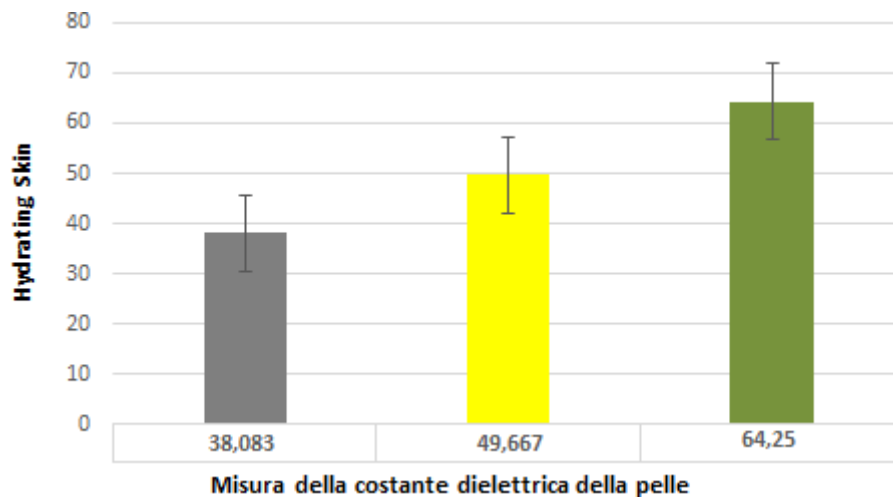


Fig.7. Istogramma idratazione cutanea: Il parametro è significativo T=2hr e T=40 day vs T=0, ($p < 0.05$)

Aumento della idratazione cutanea

Dopo 2 ore = 30,67%

Dopo 40 gg = 70,44%

Conclusioni analisi statistica elasticità e idratazione cutanea

I valori di p-corrispondenti alla statistica F dell'analisi ANOVA una via, è minore di 0,05. Tali valori indicano che uno o più trattamenti sono significativamente diversi. L'analisi statistica Bonferroni - Holm's, utilizzata per eseguire la comparazione tra i tests, confermano che i trattamenti T=2 hr e T= 40 day sono significativamente diversi dal T=0.

VALUTAZIONE ANTIRUGHE (ANALISI D'IMMAGINE)

Rughe della fronte (linee glabellari verticali)

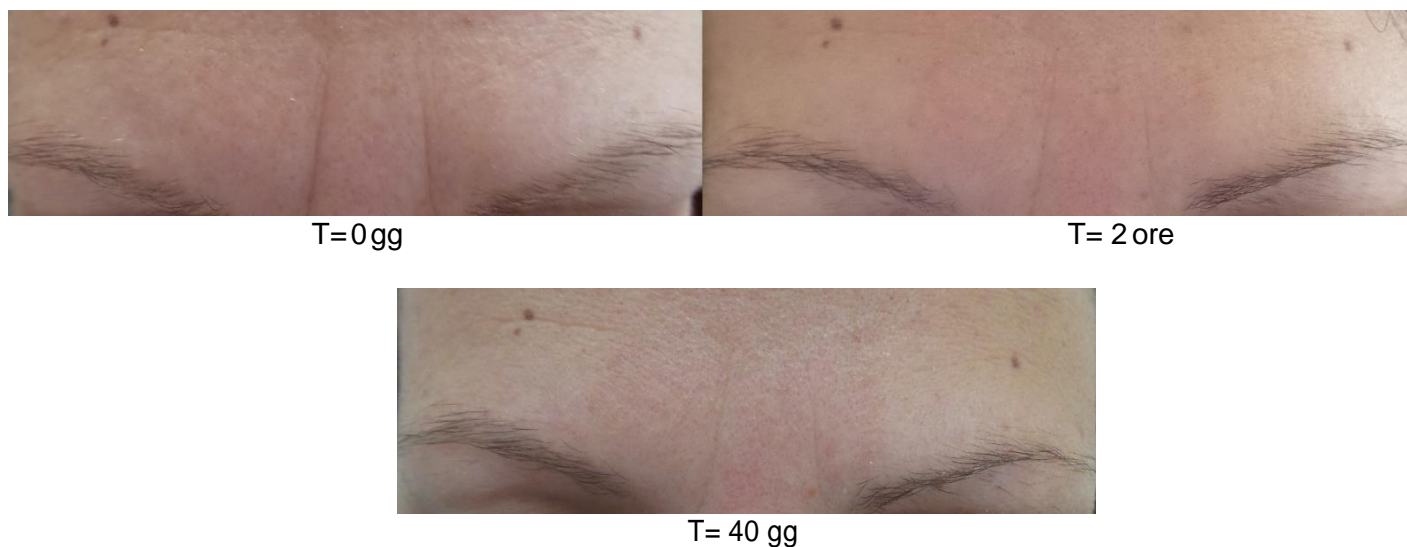


Fig. 8. AR7. Rughe frontali: tipica acquisizione di immagini con fotocamera digitale prima dell'applicazione del prodotto e dopo l'applicazione, ai tempi 0 gg, 2 ore e 40 gg

Elaborazione di immagini con microcamera "soft plus" Callegari

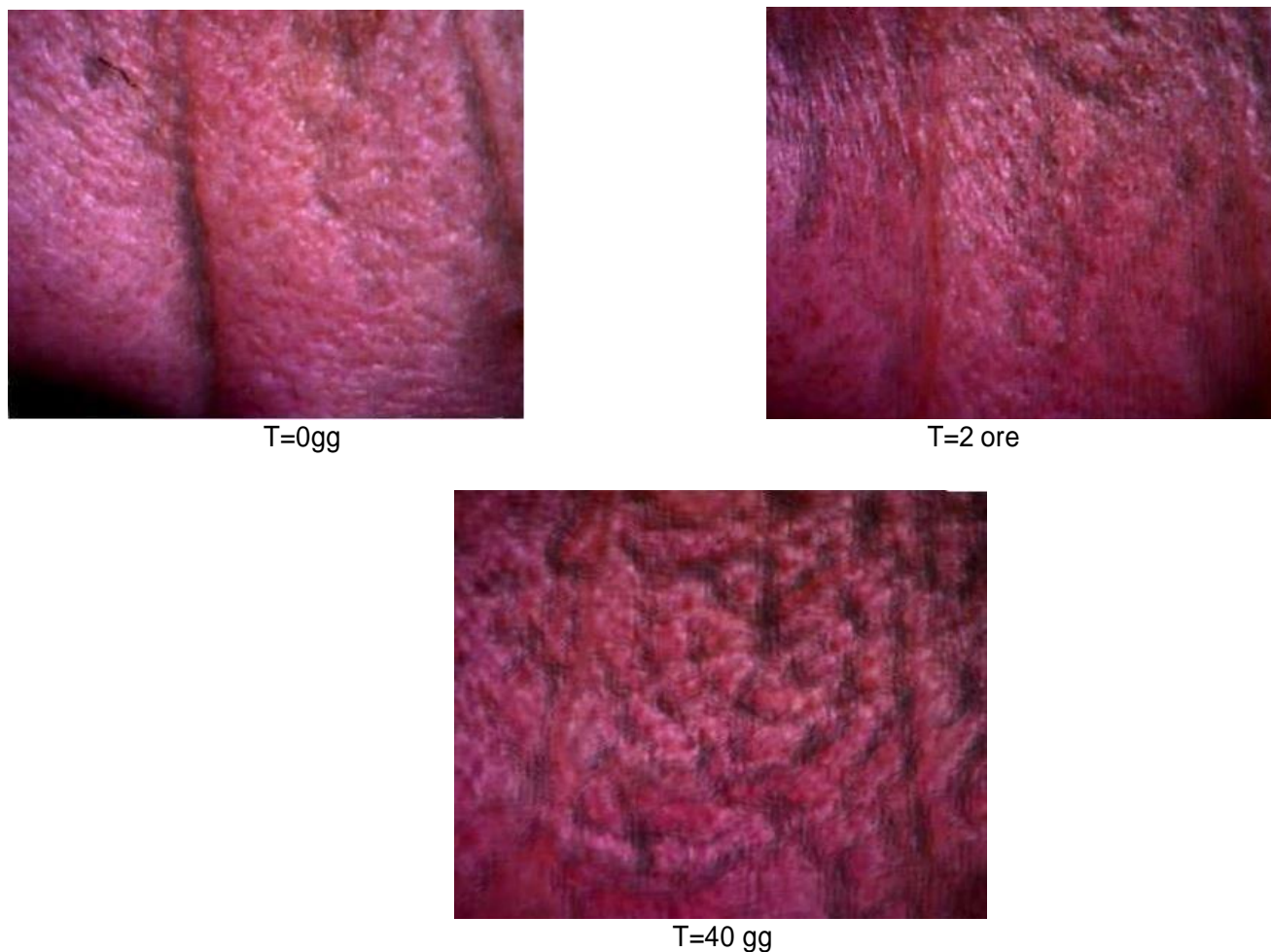


Fig. 9. AR7. Rughe frontali (linee glabellari): Tipica acquisizione di immagini con microcamera "soft plus" prima dell'applicazione del prodotto e dopo l'applicazione, ai tempi 0 gg, 2 ore e 40 gg

Elaborazione di immagini con soft plus Callegari “programma rughe”

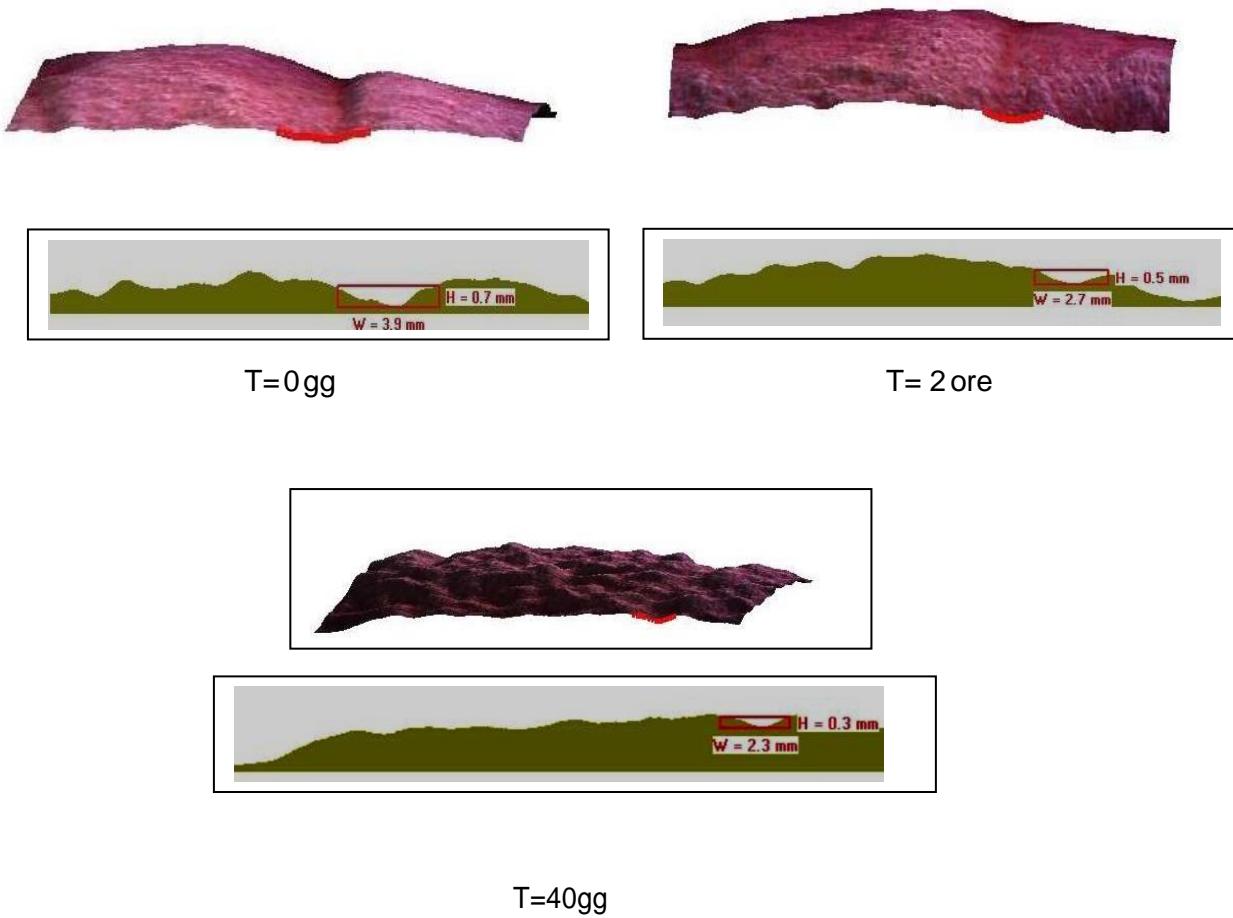


Fig.10. AR7. Rughe frontali (linee glabellari): elaborazione delle immagini, con Soft plus Callegari “programma rughe” prima dell’applicazione del prodotto T=0 gg, e dopo l’applicazione ai tempi 2 ore e 40 giorni.

Rughe periorculari: tipica valutazione di efficacia ANTIRUGHE - (acquisizione di immagini con camera digitale)

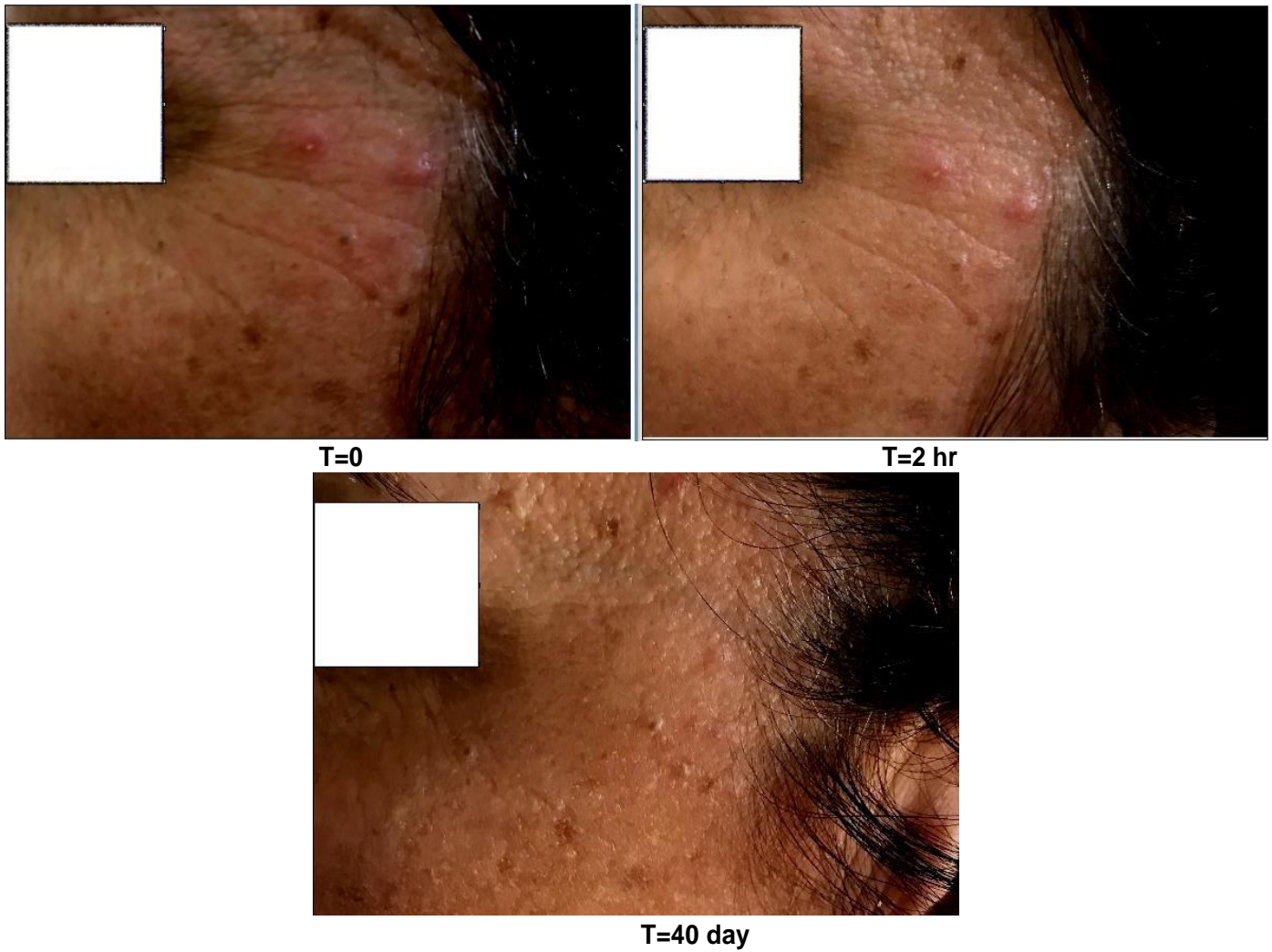
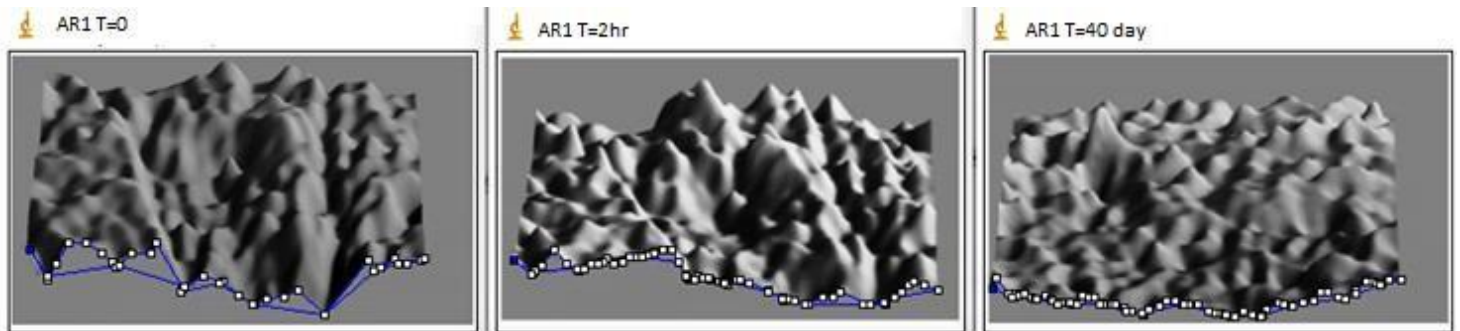


Fig.11. AR1. Rughe periorculari: tipica valutazione di efficacia dopo 2 ore e 40 giorni dall'applicazione



Results

| File | Edit | Font | Results | | | |
|------|-------------------|------|---------|--------|--------|--|
| | Label | Area | Mean | Height | IntDen | |
| 1 | AR1 T=0.tif | 1265 | 118.524 | 41 | 149933 | |
| 2 | AR1 T=2 hr.tif | 525 | 114.122 | 31 | 59914 | |
| 3 | AR1 T= 40 day.tif | 385 | 101.699 | 22 | 39154 | |

Fig. 12. Tipico tracciato di profilo rugoso T=0, 2 hr, 40 day: misure (pixel) area, altezza, integrale di densità.

Rughe periorculari: tipica valutazione di efficacia antirughe dopo 2 ore dall'applicazione

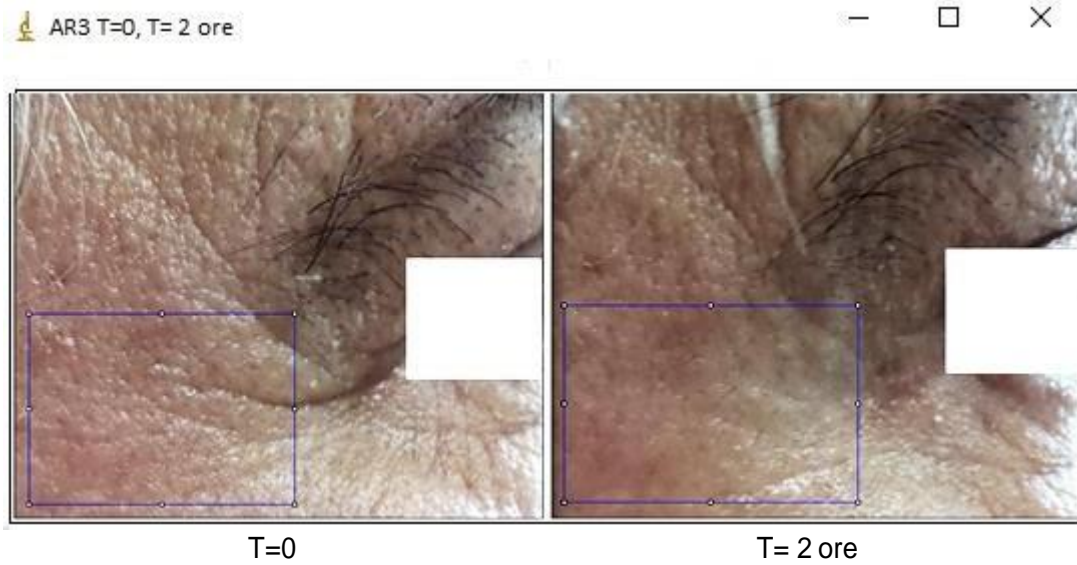
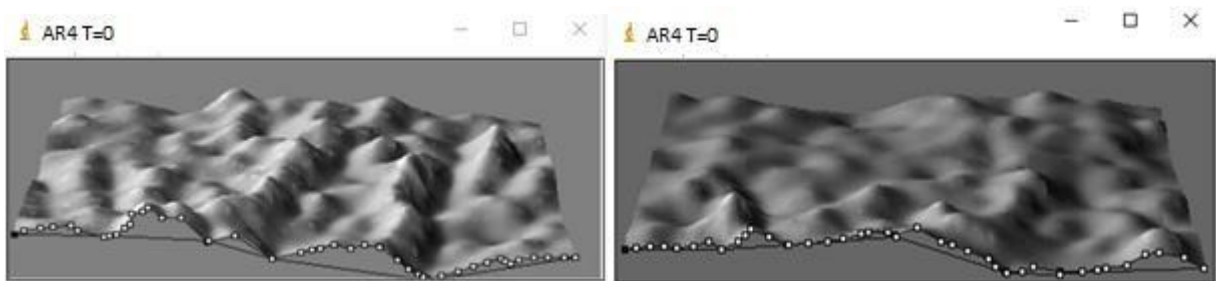


Fig.13. AR3. Rughe periorculari: tipica valutazione di efficacia dopo 2 ore dall'applicazione (acquisizione di immagini con camera digitale).



| File Edit Font Results | | | | | |
|------------------------|--------------|------|---------|--------|--------|
| | Label | Area | Mean | Height | IntDen |
| 1 | AR4 T=0 | 3179 | 128.669 | 54 | 409040 |
| 2 | AR4 T= 2 ore | 1556 | 127.026 | 38 | 197635 |

Fig. 14. Tipico tracciato di profilo rugoso T=0, T= 2 ore: misure (pixel) area, altezza, integrale di densità.

Valutazione di efficacia: profilo rugoso della pelle del viso- Parametro altezza della ruga (Height)

| SOGGETTI TRATTATI | T=0 | T= 2 ore | T=40 gg |
|--------------------------|---------------|-----------------|----------------|
| AR1 | 41 | 31 | 22 |
| AR2 | 34 | 28 | 12 |
| AR3 | 29 | 18 | 11 |
| AR4 | 54 | 38 | 14 |
| AR5 | 28 | 17 | 12 |
| AR6 | 31 | 21 | 11 |
| AR7 | 29 | 16 | 10 |
| AR8 | 22 | 13 | 9 |
| AR9 | 28 | 17 | 8 |
| AR10 | 30 | 19 | 14 |
| AR11 | 27 | 16 | 10 |
| AR12 | 22 | 12 | 8 |
| MEDIA | 30,333 | 19,5833 | 11,333 |

Tab.7. Valori ottenuti dall'analisi di immagine (riduzione della altezza delle rughe) ai tempi 0, 2 ore e 40 giorni su 12 soggetti.

| source | sum of squares SS | degrees of freedom vv | mean square MS | F statistic | p-value |
|------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| treatment | 2,178.5000 | 2 | 1,089.2500 | 26.1944 | 1.5395e-07 |
| error | 1,372.2500 | 33 | 41.5833 | | |
| total | 3,550.7500 | | | | |

Tab.8. riduzione altezza delle rughe -One -way ANOVA – 3 independent treatments (T=0, T=2hr, T= 40day).

| treatments pair | Bonferroni and Holm TT-statistic | Bonferroni p-value | Bonferroni inference | Holm p-value | Holm inference |
|------------------------|---|---------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|
| T=0 vs T=2hr | 3.6955 | 0.0015829 | ** p<0.01 | 0.0007914 | ** p<0.01 |
| T=0 vs T=40 day | 6.7034 | 2.4725e-07 | ** p<0.01 | 2.4725e-07 | ** p<0.01 |

Tab.9. Bonferroni and Holm results: only pairs relative to T=0 simultaineously compared

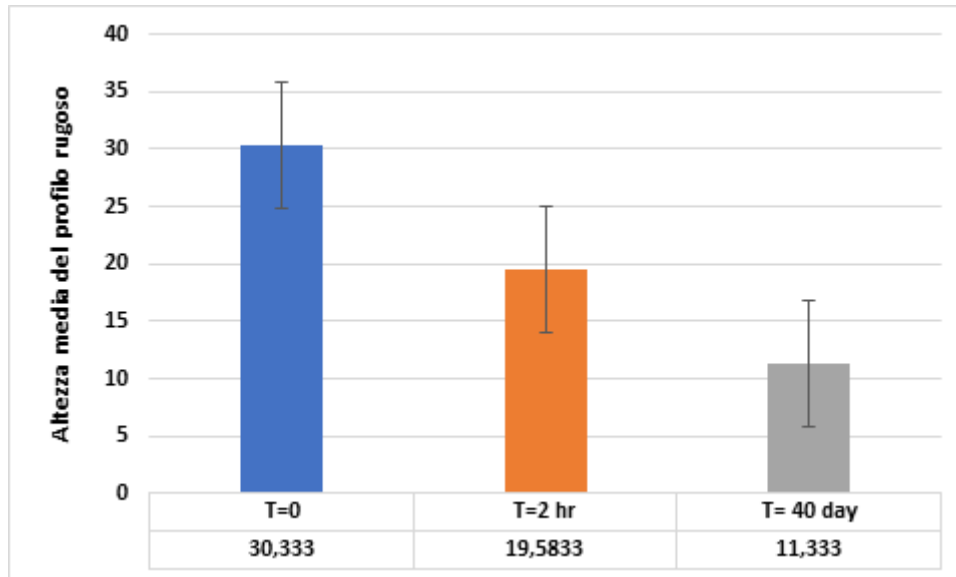


Fig.15. Tipico istogramma, parametro (Height). Valore medio dell'altezza delle rughe dei profili rugosi analizzati (12 soggetti). Il parametro, è significativo ($p < 0.05$) per tutti i trattamenti.

Diminuzione altezza delle rughe

Dopo 2 ore = 35,44%
 Dopo 40 gg = 62,64%

Diminuzione aree del profilo rugoso, espresso dal rapporto della media “mean” dei valori di grigio e l’area.

| | T=0 | T= 2 ore | T=40 gg |
|-------|----------|----------|----------|
| AR1 | 2,33E+05 | 1,21E+05 | 9,09E+04 |
| AR2 | 3,96E+05 | 2,02E+05 | 1,48E+05 |
| AR3 | 4,09E+05 | 2,19E+05 | 1,98E+05 |
| AR4 | 2,38E+05 | 1,07E+05 | 7,00E+04 |
| AR5 | 1,08E+05 | 5,21E+04 | 1,88E+04 |
| AR6 | 1,66E+05 | 1,21E+05 | 9,99E+04 |
| AR7 | 9,48E+04 | 4,78E+04 | 3,22E+04 |
| AR8 | 9,90E+04 | 3,55E+04 | 2,15E+04 |
| AR9 | 1,09E+05 | 5,24E+04 | 1,88E+04 |
| AR10 | 1,07E+05 | 4,12E+04 | 2,35E+04 |
| AR11 | 1,02E+05 | 4,69E+04 | 3,24E+04 |
| AR12 | 7,45E+04 | 3,31E+04 | 2,08E+04 |
| MEDIA | 1,73E+05 | 9,75E+04 | 6,46E+04 |

Tab.10. Misura del parametro integrale di densità (rapporto tra il valore mean e l’area in pixel) prima e dopo il trattamento

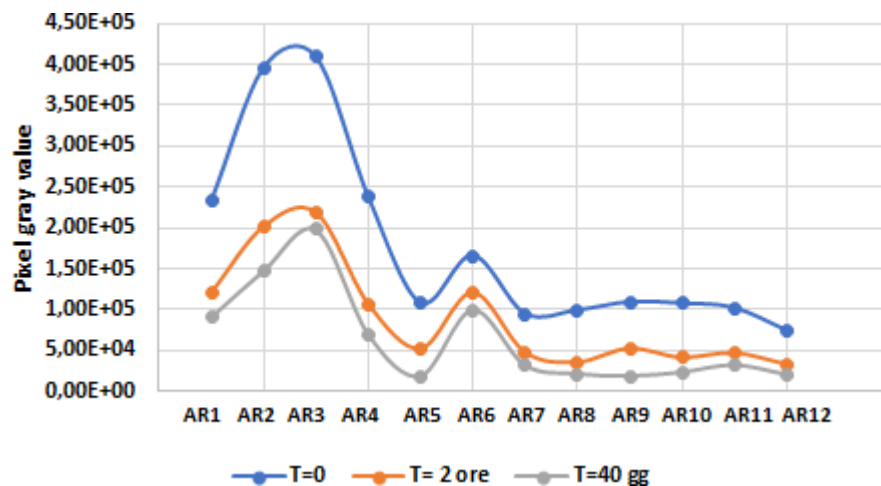


Fig.16. Tipica rappresentazione grafica del parametro integrale di densità (riduzione aree dei profili rugosi, espresso dal rapporto tra la media “mean” dei valori di grigio e l’area).

| source | sum of squares SS | degrees of freedom vv | mean square MS | F statistic | p-value |
|-----------|----------------------|-----------------------|---------------------|-------------|---------|
| treatment | 85,181,179,999.9999 | 2 | 42,590,590,000.0000 | 5.9334 | 0.0063 |
| error | 236,875,830,000.0001 | 33 | 7,178,055,454.5455 | | |
| total | 322,057,010,000.0000 | 35 | | | |

Tab.11. diminuzione area profili rugosi– integrale di densità -One -way ANOVA – 3 independent treatments (T=0, T=2hr, T=40day).

| treatments pair | Bonferroni and Holm TT-statistic | Bonferroni p-value | Bonferroni inference | Holm p-value | Holm inference |
|-----------------|----------------------------------|--------------------|----------------------|--------------|----------------|
| T=0 vs T=2hr | 2.5486 | 0.0313082 | * p<0.05 | 0.0156541 | * p<0.05 |
| T=0 vs T=40 day | 3.2815 | 0.0048874 | ** p<0.01 | 0.0048874 | ** p<0.01 |

Tab.12. Diminuzione aree profili rugosi - Bonferroni and Holm results: only pairs relative to T=0 simultaneously compared

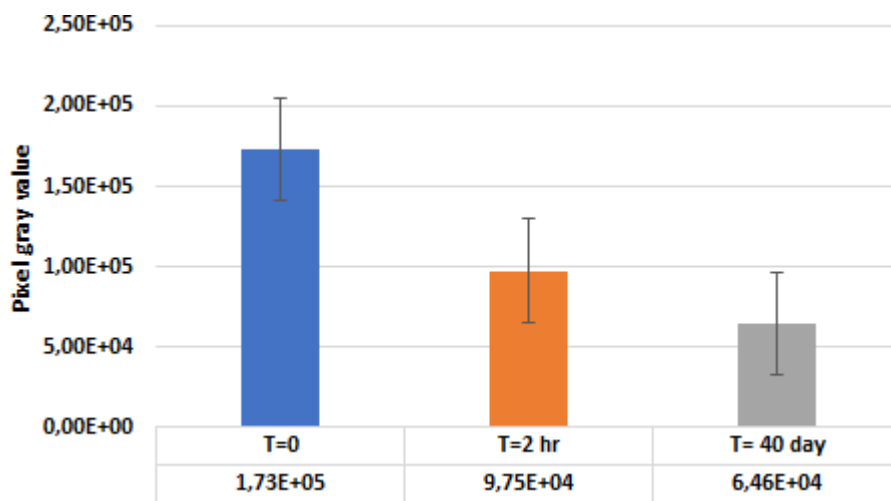


Fig.15. Tipico istogramma del parametro integrale di densità (media dei valori): diminuzione delle aree del profilo rugoso, espresso dal rapporto della media "mean" dei valori di grigio e l'area (12 soggetti). Il parametro, è significativo (p< 0.05) per tutti i trattamenti.

Diminuzione area del profilo rugoso

Dopo 2 ore = 45,78%
Dopo 40 gg = 62,65%

CONCLUSIONI

PARAMETRO IDRATAZIONE CUTANEA

La misura dell'idratazione tramite sensore capacitivo (costante dielettrica della pelle e dei tessuti sottocutanei). Evidenzia un aumento della idratazione della pelle del viso pari a:

Dopo 2 ore = 30,41%
Dopo 40 gg = 70,44%

PARAMETRO ELASTICITA' CUTANEA

L'elasticità della pelle, in seguito alla sua deformazione, sotto applicazione di vuoto, ha evidenziato un aumento della elasticità pari a:

Dopo 2 ore = 37,41%
Dopo 40 gg = 47,43%

PARAMETRI VALUTAZIONE ANTIRUGHE PER ANALISI DI IMMAGINI

1) PARAMETRO ALTEZZA DELLE RUGHE (HEIGHT)

Le analisi del profilo rugoso hanno evidenziato una diminuzione dell'altezza delle rughe pari a:

Dopo 2 ore = 35,44%
Dopo 40 gg = 62,64%

2) PARAMETRO INTEGRALE DI DENSITA' (misura in pixel della riduzione delle aree rugose espresse come rapporto tra la media dei valori di grigio e l'area).

Le analisi del profilo rugoso hanno evidenziato una diminuzione delle aree pari a:

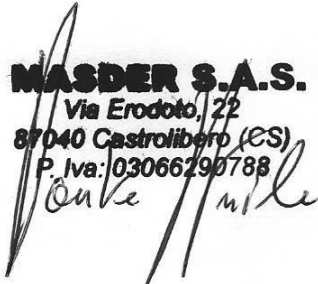
Dopo 2 ore = 45,78%
Dopo 40 gg = 62,65%

L'applicazione quotidiana del prodotto in esame, per le caratteristiche di efficacia dimostrata, può dichiarare il seguente "Claim" in etichetta (REGOLAMENTO (CE) n. 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 30 novembre 2009 sui prodotti cosmetici):

PRODOTTO ANTIRUGHE PER LA PELLE DEL VISO

Laboratorio MASDER SAS VIA
PUZZILLE snc
87040 Marano Principato (CS)

MASDER S.A.S.
Via Erodoto, 22
87040 Castrolibero (CS)
P. Iva: 03066290788



DOTT. Sergio Mazzulla
Biologo, membro della Società Italiana di Fisiologia

