

Role of Insoluble and Soluble Collagen as Skin Moisturizer

P. MORGANTI¹, S.D. RANDAZZO² and A. CARDILLO¹

¹ University School for Cosmetologists - Catholic University of Rome - Via F. Bernardini 22 - Rome - Italy

² Department of Experimental Dermatology - University of Catania - Via Iacona 7 - Catania - Italy

Received: September 30, 1986. Presented at 14th International Congress of IFSCC, September 1986, Barcelona, Spain.

Key words: Soluble Collagen, Sheet of Collagen, Skin Hydration, Long-term Cutaneous Hydration, Short-term Skin Hydration.

Synopsis

The normal state of skin hydration depends mainly on the water content present at the stratum corneum level. In order to evaluate the water-binding property of soluble and insoluble animal collagen, and in order to compare its abilities in cutaneous hydration, both the long and short-term water-binding capacity of human skin was tested «in vivo». First data shows that the presence of soluble native collagen is indispensable in order to obtain a long-lasting hydrating effect.

Introduction

According to studies carried out by several authors (1-8), cutaneous hydration and elasticity depend mainly on the water content present at the stratum corneum level. The possibility of cutaneous hydration by biological matrices of fiber collagen based upon the water-binding property of native bovine collagen, was tested using matrices enriched with 10% to 50% soluble collagen (9-17). In order to best evaluate the hydrating action performed by native soluble collagen, and to compare its effect upon cutaneous hydration to that of insoluble native collagen, both the long- and short-term water-binding capacity of human skin was tested «in vivo» by using the Corneometer CM 420 (18).

Riassunto

L'idratazione cutanea è direttamente legata alla quantità di acqua presente al livello dello strato corneo. Per meglio valutare sia le proprietà di trattenere e legare l'acqua proprie del collagene, solubile e insolubile, che di reidratare la cute, sono stati condotti test in vivo a breve ed a lungo termine. I primi dati ottenuti sembrano dimostrare che la presenza del collagene solubile sia indispensabile per ottenere una idratazione cutanea duratura ed a lungo termine.

Introduzione

Secondo gli studi di molti autori l'idratazione ed il grado di elasticità della cute dipendono essenzialmente dalla quantità d'acqua presente a livello dello strato corneo (1-8).

Data la notevole capacità di legare acqua posseduta dal collagene nativo bovino, si è voluta controllare l'eventuale attività idratante esercitata da matrici biologiche di collagene in fibre, arricchite per il 10% o per il 50% con collagene solubile, ed utilizzate come matrici biologiche di copertura a funzione attiva idratante ed elasticizzante (9-17).

Per poter meglio valutare l'attività svolta dal collagene solubile nativo e volendo confrontare con l'idratazione cuta-

Materials and methods

Materials

Three different biological matrices of native animal collagen (bovine) were employed. Each matrix was in the form of sheets approximately 1 mm thick, suitable for use as facial masks (19). These biological matrices consisted respectively of: insoluble native collagen (type 1), of 90% insoluble native collagen plus 10% soluble native collagen (type 2), and 50% insoluble native collagen plus 50% soluble native collagen (type 3). Each was provided in the form of a preservative-free thin white sheet packed in individual polyethylene envelopes measuring 21 × 29.6 cms.

Additionally, a spray of soluble collagen diluted in a water solution of aloe-vera, and a spray of demineralized water were employed. Both the collagen solution and the water were contained in bottles under nitrogen atmosphere having atomizers to nebulize the product.

Finally, a cleansing milk of our formulation was used (20). No other materials (cosmetic, cleansing, etc.) were permitted on the subjects skin.

Instruments

The Corneometer CM 420, based on the principle of constant dielectric measurements, was used to assess hydrating activity (18).

Method

60 women between 20 and 36 years of age participated in the trials for a period of 60 days. The experimental treatment was always carried out at 10:00 a.m. on skin cleansed one hour before with our cleansing milk. The collagen biological matrix

ne provocata dall'azione del collagene nativo insolubile, è stato controllato «in vivo» il potere di legare acqua della cute umana sia a breve che a lungo periodo mediante l'utilizzazione del Corneometer CM 420 (18).

Materiali e metodi

Materiali

Sono state utilizzate tre diverse matrici biologiche di collagene nativo animale (bovino) confezionate in fogli dello spessore di 1 mm ed adatte per essere utilizzate quali maschere di copertura a funzione attiva per il ripristino dell'idratazione e dell'elasticità del mantello cutaneo (19).

Queste matrici biologiche erano composte rispettivamente del 100% di collagene nativo insolubile (Tipo 1); del 90% di collagene nativo insolubile e del 10% di collagene nativo solubile (Tipo 2); del 50% di collagene nativo insolubile e del 50% di collagene nativo solubile (Tipo 3).

Tutti e tre i tipi si presentano come fogli bianchi, sottili, privi di conservanti e confezionati in buste di polietilene e delle dimensioni di cm 21 × 29,6.

È stato, inoltre, utilizzato uno spray di collagene solubile disciolto in una soluzione acquosa di aloe vera ed uno spray di acqua demineralizzata.

Sia l'acqua che la soluzione di collagene erano contenute in flaconi sotto azoto e con erogatori adatti per nebulizzare il prodotto in goccioline molto fini.

Dieci giorni prima e durante il periodo di trattamento tutti i soggetti non hanno utilizzato alcun prodotto cosmetico ad eccezione di un latte detergente, da noi formulato, adoperato al mattino come latte di pulizia (20).

was applied on facial skin, using four areas of the face: forehead, right cheek, left cheek, and chin. These areas were pre-moistened with de-ionized water or with the aqueous solution of collagen. An environment at controlled temperature and humidity (18°C , $\text{RH} \geq 50\%$) was used. The women under testing were divided into 6 groups of ten and treated as follows:

I. Application of type 1 biological matrix on skin moistened with de-ionized water only.

II. Application of type 1 biological matrix on skin moistened with the soluble collagen solution.

III. Application of type 2 biological matrix on skin moistened with de-ionized water only.

IV. Application of type 2 biological matrix on skin moistened with the soluble collagen solution.

V. Application of type 3 biological matrix on skin moistened with de-ionized water only.

VI. Application of type 3 biological matrix on skin moistened with the soluble collagen solution.

After moistening the face, the biological matrix was immediately applied and left in situ for 30 minutes, following the method described by Berg and Dieringer (19). After removal of the biological matrix, the face was lightly blotted with a dry cloth in order to eliminate any possible water residues. The four areas selected for testing (forehead, each cheek, and chin) were evaluated by means of the Corneometer CM 420. The average of three measurements carried out in each of the four areas (mean of twelve values) was taken as the measurement value.

Tests

Short-term and long-term controls were

Apparecchi

Per il controllo dell'attività idratante è stato utilizzato il Corneometer CM 420 basato sul principio delle costanti dielettriche (18).

Metodica di trattamento

La matrice biologica di collagene è stata applicata sulla cute del viso preventivamente inumidito con acqua deionizzata o con la soluzione acquosa di collagene spray (4 erogazioni, una per ogni zona del volto; fronte, guancia destra, guancia sinistra e zona del mento). Sono state sottoposte a trattamento 60 donne di età compresa tra 29 e 36 anni e per un periodo di 60 giorni.

Dopo aver inumidito il volto la matrice biologica viene applicata e lasciata in situ per 30 minuti, secondo la metodica descritta da Berg e Dieringer (19).

Tolta la matrice biologica si tampona leggermente il viso con un panno asciutto per eliminare gli eventuali residui di acqua e si controllano con il Corneometer CM 420 le quattro zone prescelte per le misurazioni: la fronte, le due guance ed il mento. Come valore di misurazione viene utilizzata la media delle tre letture eseguite in ognuna delle quattro zone (media di dodici valori).

Il trattamento è stato effettuato sempre al mattino (ore 10) su cute deterosa da 1 ora con un latte detergente di nostra formulazione, in un ambiente a temperatura ed umidità controllata (18°C $\text{RH} \geq 50\%$). Le donne sottoposte alla sperimentazione e suddivise in 6 gruppi di dieci, sono state così trattate:

I gruppo: Applicazione della matrice biologica di tipo 1 su cute inumidita con sola acqua deionizzata.

II gruppo: Applicazione della matrice biologica di tipo 1 su cute inumidita con soluzione di collagene solubile.

carried out on each of the 6 groups: the first following the sorption-desorption test by Tagami et al. (21), the second following the Mosler method (18).

Short-term Water Sorption-Desorption Test

Tagami's method, already employed by us and described in previous studies (22-24), establishes control measurements at 30, 60, 90 and 120 seconds in a previously defined 1 cm×1 cm area of treated skin. Figures 1-6 show the results obtained.

III gruppo: Applicazione della matrice biologica di tipo 2 su cute inumidita con sola acqua deionizzata.

IV gruppo: Applicazione della matrice biologica di tipo 2 su cute inumidita con soluzione di collagene solubile.

V gruppo: Applicazione della matrice biologica di tipo 3 su cute inumidita con sola acqua deionizzata.

VI gruppo: Applicazione della matrice biologica di tipo 3 su cute inumidita con soluzione di collagene solubile.

Su ognuno dei sei gruppi sono stati eseguiti un controllo a breve termine utilizzando la metodica dell'assorbimento-

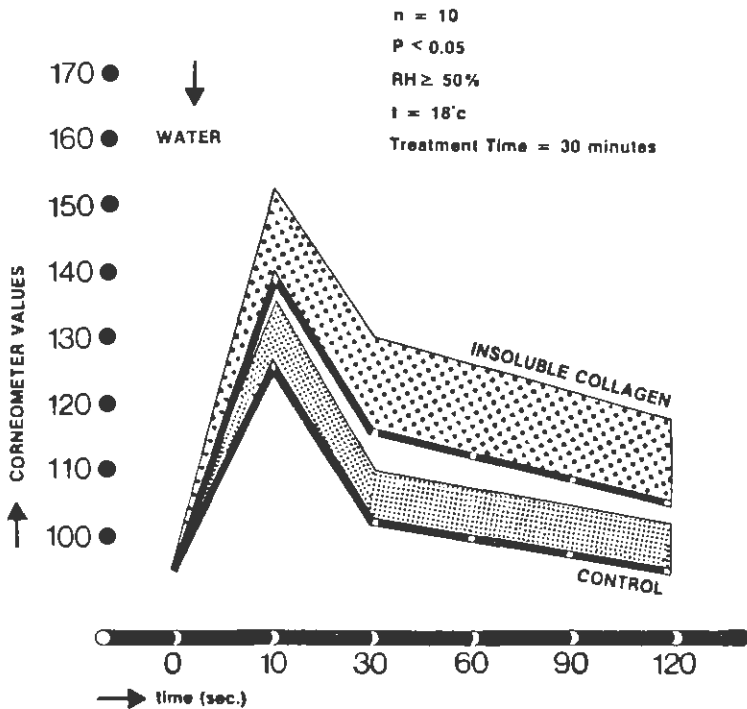


Fig. 1: Increase of cutaneous hydration after topical application of a biological matrix consisting of **insoluble fibrils of native collagen**, following the sorption-desorption test carried out on human skin previously treated with demineralized water.

Fig. 1: Aumento dell'idratazione cutanea dopo applicazione topica di una matrice biologica di fibrille **insolubili di Collagene bovino nativo**, secondo il test dell'assorbimento-cessione, effettuato su cute umana preventivamente trattata con **acqua demineralizzata**.

Long-term Assessment of Human Cutaneous Hydration

The long-term test was carried out on all groups for a period of 60 days. All cosmetic treatments not pertinent to the experiment were suspended ten days prior to the beginning of the testing period and during the test treatment. The control groups used only the cleansing milk as provided. The collagen biological sheets

cessione di Tagami e coll. (21) ed un controllo a lungo termine utilizzando la metodica di Mosler (18).

Test a breve termine dell'assorbimento-cessione dell'acqua

La metodica di Tagami già da noi utilizzata e descritta in precedenti lavori (22-24) prevede misurazioni di controllo

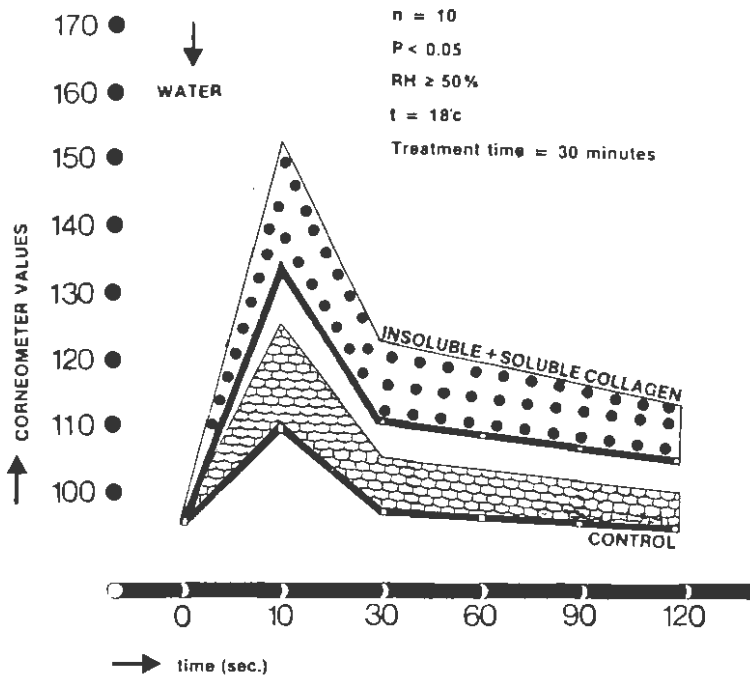


Fig. 2: Increase of cutaneous hydration after topical application of a biological matrix consisting of collagen insoluble fibrils, following the sorption-desorption test, carried out on human skin previously treated with a soluble native bovine collagen solution.

Fig. 2: Aumento dell'idratazione cutanea dopo applicazione topica di una matrice biologica di fibrille insolubili di Collagene, secondo il test dell'assorbimento-cessione, effettuato su cute umana preventivamente trattata con soluzione di Collagene solubile.

were applied twice a week, on Mondays and Thursdays, for the entire 60 day period for a total of 16 applications. Slightly modifying Mosler's method (18), the mean of three measurements (10 a.m. 2 and 6 p.m.) in each skin area was taken as the hydration value of the day. The measurements were made twice a week (Tuesdays and Fridays) for a total of 48 mean measurements (one for each facial area) for each subject. These results are shown in Figure 7.

a 30, 60, 90 e 120 secondi dopo l'applicazione di acqua e successiva sua eliminazione in una zona precedentemente delimitata di 1 cm × 1 cm. I risultati ottenuti sono riportati nelle Figure 1-6.

Valutazione dell'idratazione cutanea su cute umana: test a lungo termine

Il test a lungo termine è stato condotto su tutto il gruppo sottoposto a sperimen-

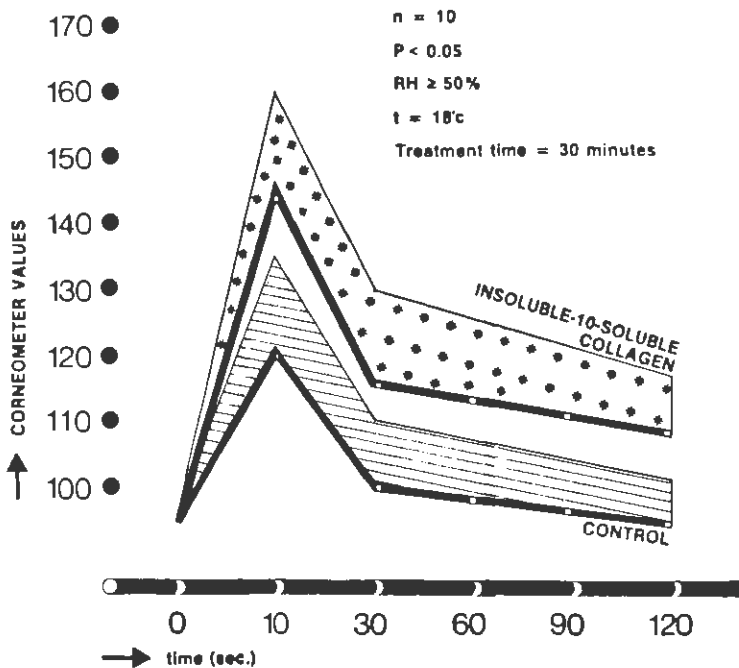


Fig. 3: Increase of cutaneous hydration after topical application of a biological matrix consisting of collagen insoluble fibrils enriched with 10% soluble native bovine collagen, carried out on human skin previously treated with demineralized water.

Fig. 3: Aumento dell'idratazione cutanea dopo un'applicazione topica di una matrice biologica di fibrille insolubili di Collagene arricchite con il 10% di collagene bovino nativo solubile, effettuato su cute umana preventivamente trattata con acqua demineralizzata.

Results and comments

As shown in Figures 1, 2 and 3, the short-term hydration test produced a 20% ($P < 0.05$) increase of skin water-binding capacity. This is obtained by using both Type 1 matrix (insoluble collagen) and Type 2 matrix (90% insoluble plus 10% soluble collagen) or Type 1 matrix after spray application of the soluble collagen solution. On the contrary, a hydration increase of approximately 30% ($p < 0.05$) takes place in the short-term by using either:

tazione e per un periodo di 60 giorni. Tutti i trattamenti cosmetici estranei alla sperimentazione sono stati sospesi dieci giorni prima dell'inizio del periodo sperimentale e durante il periodo di trattamento; i gruppi sottoposti a controllo hanno utilizzato soltanto il latte detergente da noi fornito. Le matrici biologiche di collagene sono state applicate bisettimanalmente, il lunedì ed il giovedì, per tutto il periodo dei 60 giorni, per un totale di 16 applicazioni. Seguendo la metodica di Mosler (18), da

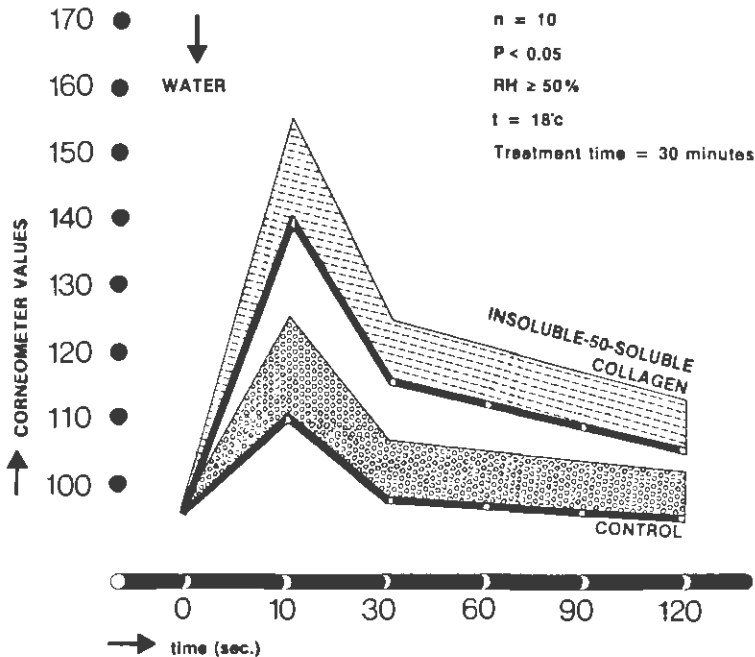


Fig. 4: Increase of cutaneous hydration after topical application of a biological matrix consisting of collagen insoluble fibrils enriched with 50% soluble native bovine collagen, following the sorption-desorption test, carried out on human skin previously treated with demineralized water.

Fig. 4: Aumento dell'idratazione cutanea dopo applicazione topica di una matrice biologica di fibrille insolubili di Collagene arricchite con il 50% di collagene bovino nativo solubile, secondo il test dell'assorbimento-cessione, effettuato su cute umana preventivamente trattata con acqua demineralizzata.

Type 3 matrix after topical application of water (50% insoluble plus 50% soluble collagen) (Fig. 4), or Type 2 matrix (Fig. 5) and Type 3 matrix (Fig. 6), following topical application of spray collagen.

From the data reported in Fig. 7 on long-term hydration, one can observe:

a) A negligible increase during the entire 60 day treatment period for subjects treated with Type 1 matrix (insoluble collagen);

noi leggermente modificata, è stata registrata come valore di idratazione del giorno la media delle 3 misurazioni effettuate durante le ore diurne (rispettivamente alle 10, alle 14 ed alle 18). Le misurazioni sono state eseguite due volte la settimana (martedì e venerdì) per un totale di 48 misurazioni medie per ogni soggetto. Come valore di misurazione viene utilizzata, infatti, la media delle tre letture eseguite in ognuna delle quattro zone del

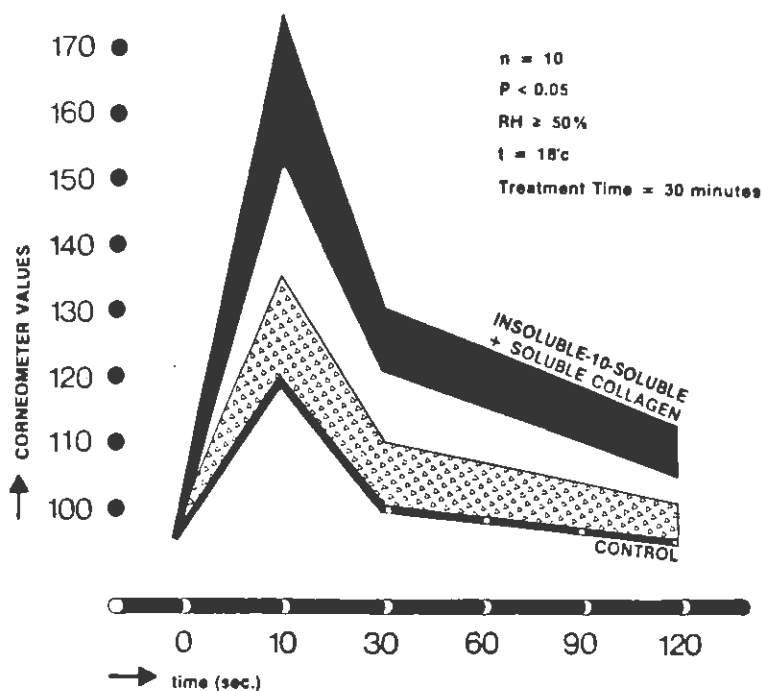


Fig. 5: Increase of cutaneous hydration after topical application of a biological matrix consisting of collagen insoluble fibrils enriched with 10% soluble native bovine collagen, following the sorption-desorption test carried out on human skin previously treated with a soluble collagen solution.

Fig. 5: Aumento dell'idratazione cutanea dopo applicazione topica di una matrice biologica di fibrille insolubili di collagene arricchite con il 10% di collagene bovino nativo solubile, secondo il test dell'assorbimento-cessione effettuato su cute umana preventivamente trattata con una soluzione di collagene solubile.

- b) an increase of about 10% ($P < 0.05$) both for subjects **simultaneously** treated with Type 1 matrix and the spray soluble collagen, and for those treated with Type 2 matrix;
- c) an increase of approximately 20% both for the subjects treated with Type 2 matrix together with the spray collagen, and for those treated either with Type 3 matrix alone or in combination with the spray soluble collagen.

viso precedentemente indicate. Ogni valore rappresenta, quindi, la media di dodici valori di lettura. I risultati ottenuti sono riportati nella figura 7.

Risultati e commenti

Come si può vedere dalle figure 1, 2 e 3 con il test di idratazione a breve termine si ottiene un incremento del 20% ($P < 0,05$) nella capacità della cute di trat-

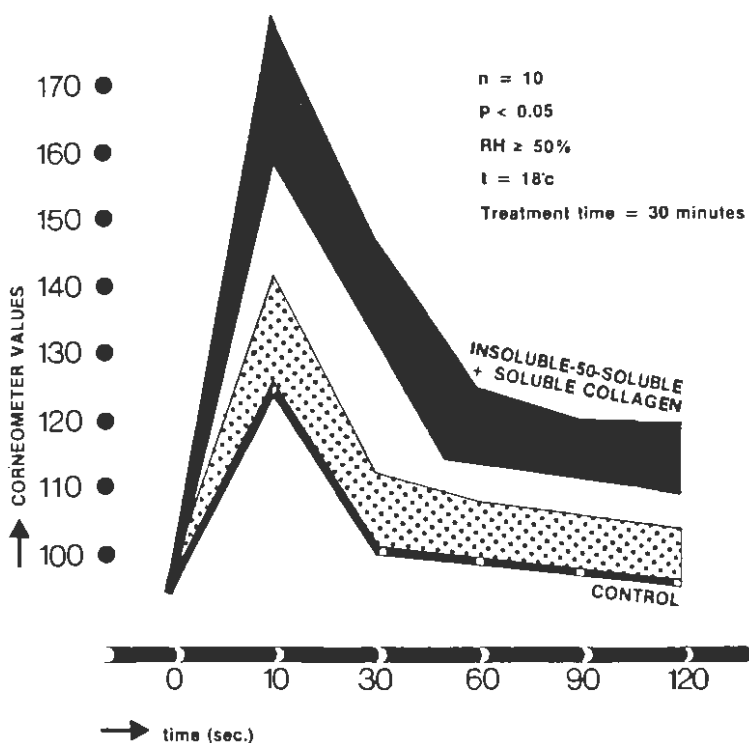


Fig. 6: Increase of cutaneous hydration after topical application of a biological matrix consisting of collagen **insoluble fibrils** enriched with 50% **soluble native bovine collagen**, following the sorption-desorption test carried out on human skin previously treated with a **soluble collagen** solution.

Fig. 6: Aumento dell'idratazione cutanea dopo applicazione topica di una matrice biologica di fibrille **insolubili di Collagene** arricchite con il 50% di **collagene bovino nativo solubile**, secondo il test dell'assorbimento-cessione effettuato su cute umana preventivamente trattata con una **soluzione di collagene solubile**.

This data suggest that a 20% to 30% degree of enhancement of short-term hydration can always be obtained with the insoluble native collagen biological matrix whether or not the soluble native collagen results in an increase of the obtained hydration level.

Long-term data, however, show that the presence of soluble native collagen is indispensable in order to obtain a long-lasting hydrating effect. One can observe continuous increase of long-term cutaneous hydration up to a maximum value of 20%. However, after increasing the presence of soluble collagen up to certain limit (Type 3 matrix plus spray soluble collagen), no further increase of hydration is obtained. It would seem, therefore, that soluble collagen is indispensable

tenere acqua utilizzando sia la matrice biologica tipo 1 (collagene insolubile) che la matrice tipo 2 (90% collagene insolubile + 10% solubile) o la tipo 1 dopo applicazione della soluzione di collagene solubile spray. Utilizzando invece la matrice biologica tipo 3 dopo applicazione topica d'acqua (50% collagene insolubile + 50% solubile) (Fig. 4) o la tipo 2 (Fig. 5) e la tipo 3 (Fig. 6) dopo applicazione topica del collagene spray, si verifica un incremento dell'idratazione a breve del 30% ($P < 0,05$).

Se si controllano dalla Fig. 7 i dati dell'idratazione indotta a lungo periodo, si può osservare:

- a) un incremento quasi nullo, durante tutto il periodo di trattamento dei sessanta giorni, per i soggetti trattati con la

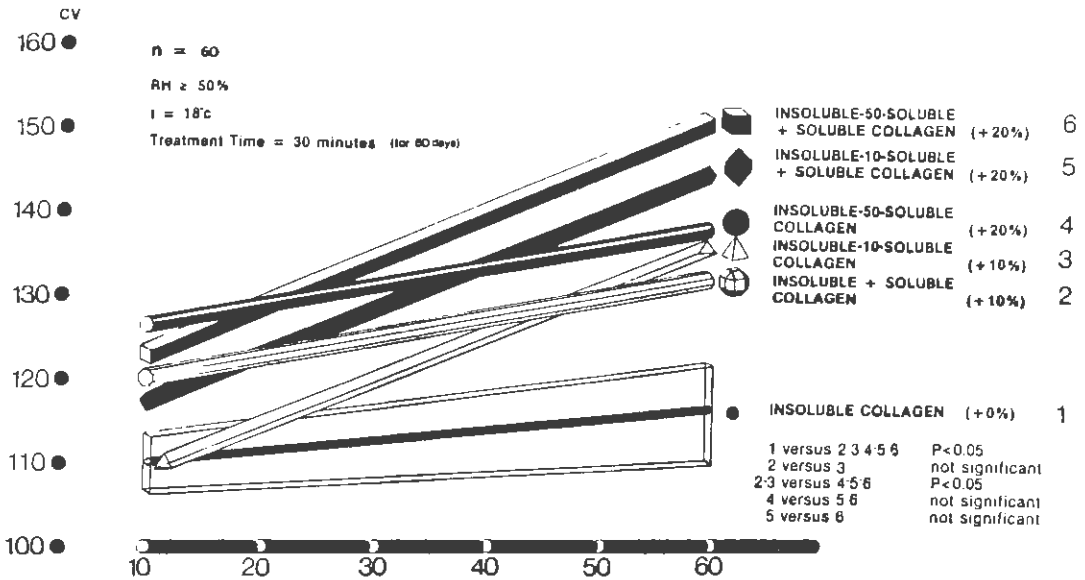


Fig. 7: Increase of hydration of human skin topically treated with different biological matrices consisting of fibrils of native bovine collagen (average number of people for any single treatment: 10).

Fig. 7: Aumento dell'idratazione della cute umana trattata topicamente con differenti matrici biologiche di fibrille di collagene bovino nativo (media di 10 persone per singolo trattamento).

to attain a long-lasting improvement of skin hydration, provided the appropriate concentrations utilized. The presence of a greater quantity of soluble collagen in a cosmetic product cannot improve its effectiveness when it goes beyond the probable threshold level which can possibly be utilized by human skin.

- matrice tipo 1 (collagene insolubile);
- b) un incremento del 10% circa ($P < 0,05$) sia per i soggetti trattati contemporaneamente con la matrice tipo 1 e con il collagene solubile spray che con quelli trattati con la matrice biologica tipo 2 (90% collagene insolubile + 10% solubile);
- c) un incremento del 20% circa sia per i soggetti trattati con la matrice biologica tipo 2 assieme al collagene spray che con quelli trattati con la matrice biologica tipo 3 tal quale o aggiunta del collagene solubile spray.

Da questi primi dati sembra quindi potersi desumere che una certa idratazione a breve è sempre ottenibile con le matrici biologiche di collagene nativo insolubile a prescindere dalla presenza o meno del collagene solubile nativo. La presenza del collagene nativo solubile aumenta, però, il grado di idratazione ottenibile. Si passa infatti da un aumento medio del 20% ad un aumento del 30%.

Dai dati a lungo periodo si nota, però, come sia indispensabile la presenza del collagene nativo solubile per ottenere un effetto idratante duraturo. Si nota così un incremento continuo dell'idratazione cutanea fino ad un massimo del 20%. Aumentando, cioè, la presenza del collagene solubile oltre un certo limite (matrice tipo 3 + collagene solubile spray) non si ottiene un ulteriore aumento dell'idratazione. Il collagene solubile sembrerebbe quindi indispensabile per migliorare l'idratazione durevolmente nel tempo, ma utilizzato però in dosaggi appropriati. La maggior quantità di collagene solubile presente in un prodotto cosmetico non sembra poterne migliorare l'efficacia, quando si sia superata una probabile soglia di utilizzazione, propria della cute umana.

REFERENCES

1. Blank I.H. (1952) «Factors which influence the water content of the stratum corneum» *J. Invest. Dermatol.* **18**, 433-440.
2. Blank I.H. (1953) «Further observation on factors which influence the water content of the stratum corneum» **21**, 259-69.
3. Middleton J.D. (1968) «The mechanism of water binding in stratum corneum» *Brit. J. Dermatol.* **80**, 437-50.
4. Singer E.J. and Vinson J. (1966) «The water binding properties of skin» *Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Ass.* **46**, 29-33.
5. Middleton J.D. and Allen B.M. (1973) «The influence of temperature and humidity on stratum corneum and its relation to skin chapping» *J. Soc. Cosmet. Chem.* **24**, 239-43.
6. Anderson R., Cassidy J.M., Hansen J.R. and Yellin W. (1973) «The effect of in vivo occlusion on human stratum corneum hydration-dehydration in vitro» *J. Invest. Dermatol.* **61**, 375-9.
7. Anderson R.L., Cassidy J.M., Hansen J.R. and Yellin W. (1973) «Hydration of stratum corneum» *Bio-polymers* **12**, 2789-2802.
8. Spencer T.S. (1976) «Water and the horny layer» *J. Soc. Cosmet. Chem.* **27**, 63.
9. Riso R.R. (1969) «Protein derivates - Moisture and that Look of Youth» *Aerosol Age*, **14**, 30.
10. Riso R.R. (1974) «Protein derivates in cosmetics» *Cosmet. Perfum.* **89**, 45-8.
11. Cooperman E.S. (1972) «Protein hydrolysates as skin moisturizers» *Am. Cosmet. Perf.* **87**, 65-7.
12. Groher B. (1976) «Losliches kollagen in kosmetischen preparation» *Seifen Ole Fette Wachse* **102**, 499-500.
13. Chvapil M. (1979) «Industrial use of collagen» in: Parry D.A.D. and Creamer L.K. Eds. *Fibrous Proteins: Scientific Industrial and Medical aspects Acad. Press.* **1**, 247-69.
14. Todd R.D. (1975) «Soluble collagen: new protein for cosmetics» *Drug. Cosmet. Industr.* **117**, 50-2, 56, 134-38.
15. Chvapil M. and Eckmayer Z. (1985) «Role of proteins in cosmetics» *Int. J. Cosmet. Sci.* **7**, 41.
16. Secchi G.F. (1986) «Il collagene in cosmetica» *Cosmesi Dermatologica* **1**, 50.
17. Reimtschneider R. und Chlk W.H. (1977) «Über das wasserbindungsvermögen loslicher kollagene» *Ri-
cehstoffe, Arome, Kosmetich*, **17**, n. 7.
18. Mosler K. (1983) «Hautfeuchtigkeitsmessung kein problem mit dem corneometer C.M. 420» *Parf. und
Kosmetik* **64**, 375.
19. Berg A. and Dieringer H. (1984) «La maschera di collagene-applicazione cosmetica e controllo analiti-
co» *Cosmet. and Toiletries* Ed. Ital. **5**, 21.
20. Morganti P. and Randazzo S.D. (1984) «I detergenti cutanei: valutazione biologica della loro attività»
Relata Technica XVI, 25.
21. Tagami H., Kanamaru Y., Inoue K. Svehisa S., Inove F., Iwatsuki K., Yoshikum K. and Yamada M.
(1982) «Water sorption-desorption test of the skin "in vivo" for functional assessment of the stratum
corneum» *J. Invest. Dermatol.* **78**, 425.
22. Morganti P. (1983) «L'attività idratante di alcuni principi attivi di origine naturale valutata "in vivo"
mediante le misurazioni delle costanti dielettriche» presented at 2° Congresso Naz. Soc. Ital. di Far-
macognosia, Milano 15 dic.
23. Morganti P. (1984) «Controllo in vivo dell'idratazione cutanea» presented at XI Congr. Naz. SICC, Bo-
logna 29 nov.
24. Morganti P. and Randazzo S.D. «Oral treatment of skin dryness» *J. Appl. Cosmetol.* in print.