

***Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil: Unraveling potential benefits on human skin**

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf óleo essencial: Desvendando potenciais benefícios na pele humana

Sérgio Faloni de Andrade ¹, Eucinário José Pinheiro ¹, Catarina Pereira-Leite ^{1,2}, Maria do Céu Costa ^{1,2}, Ana Cristina Figueiredo ³, Luis Monteiro Rodrigues ^{1*}

¹CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal; ²LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal; ³Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM Ciências), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), Biotecnologia Vegetal (BV), Departamento de Biologia Vegetal (DBV), Lisboa, Portugal

* corresponding author / autor para correspondência: monteiro.rodrigues@ulusofona.pt

Abstract

The essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf is widely used for the production of fragrances, cosmetics, and detergents. However, there is no information on the effects of formulations containing *C. citratus* essential oil (EOCC) on human skin. This study aimed to evaluate the effects of formulation containing EOCC on human skin physiology. The study involved participants of both sexes (n=12). Two areas (3 cm x 3 cm) were drawn on both forearms. One randomly chosen area was treated for 14 days, 2 times/day with polyacrylic acid gel containing 5% EOCC and the other was used as a control for the same time period. Transepidermal water loss (TEWL), hydration, epidermal lipids, and biomechanics were measured (D0 and D14). High resolution Sonography images were also obtained. Results revealed a significant decrease in TEWL, a significant increase in hydration, firmness and elasticity, and a decrease in lipids, in the areas treated with EOCC. Sonography showed an increase in echogenicity of the epidermis after applying the formulation indicating that the essential oil penetrates only the most superficial layers of the skin. Results also suggest that formulations containing EOCC are safe for topical application and can improve and protect human skin.

Keywords: *Cymbopogon citratus*; essential oil; citral; lemongrass

Resumo

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf é amplamente utilizado para a produção de fragrâncias, cosméticos e detergentes. Entretanto, não há informações sobre os efeitos de formulações contendo óleo essencial de *C. citratus* (EOCC) na pele humana. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da formulação contendo EOCC na fisiologia da pele humana. O estudo envolveu participantes de ambos os sexos (n=12). Duas áreas (3 cm x 3 cm) foram desenhadas em ambos os antebraços. Uma área escolhida aleatoriamente foi tratada durante 14 dias, 2 vezes/dia com gel de ácido poliacrílico contendo 5% de EOCC e a outra foi utilizada como controlo durante o mesmo período de tempo. Foram medidas perdas de água transepidermica (PTEA), hidratação, lípidos epidérmicos, e biomecânica (D0 e D14). Foram também obtidas imagens de sonografia de alta resolução. Os resultados revelaram uma diminuição significativa na PTEA, um aumento significativo na hidratação, firmeza e elasticidade, e uma diminuição nos lípidos, nas áreas tratadas com EOCC. A sonografia mostrou um aumento da ecogenicidade da epiderme após a aplicação da formulação, indicando que o óleo essencial penetra apenas as camadas mais superficiais da pele. Os resultados também sugerem que as formulações contendo EOCC são seguras para aplicação tópica e podem melhorar e proteger a pele humana.

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*; óleo essencial; citral; capim-limão; erva-príncipe

Introduction

Currently, there is a great interest in natural products that might benefit human skin physiology. Many essential oils have been indicated as potentially interesting by combining beneficial effects on the skin while providing pleasant organoleptic properties to formulations. In addition, some essential oils have been used in traditional medicine for over 5,000 years, with many purposes, including anti-inflammatory, analgesic, antifungal, antimicrobial, antioxidant (1,2) and also to prevent skin aging (3,4). Due to their lipid characteristics, certain essential oils might be interesting for the treatment of cutaneous xerosis, a common condition in the elderly characterized by excessively dry skin resulting from an imbalance of lipids in the most superficial layer of the skin (5,6).

However, there are uncertainties about the safety of these products, as irritation, sensitivity, and contact dermatitis have been reported in human skin (7-9). It is important to point out that most efficacy and safety studies about the application of essential oils on the skin have been conducted *in vitro* (using skin cell lines) or in animal models, using multiple methodologies which are difficult to compare or extrapolate to human. Thus, the scarcity of studies on humans has limited the potential use of essential oils as effective and safe phytotherapeutic agents. Further studies are needed to verify the efficacy and safety of these products (3,10).

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, commonly known as lemongrass, is an important medicinal plant cultivated in different regions of the world, including Portugal. Its essential oil, whose principal component is the monoterpene citral, is widely used to produce fragrances, cosmetics, detergents, and pharmaceutical products (11,12). However, there is no scientifically-based information on the effects of formulations containing *C. citratus* essential oil (EOCC) on human skin. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effects of a formulation containing EOCC on the skin physiology of healthy volunteers

Introdução

Atualmente, existe um grande interesse em produtos naturais que possam beneficiar a fisiologia da pele humana. Muitos óleos essenciais têm sido apontados como potencialmente interessantes, combinando efeitos benéficos sobre a pele ao mesmo tempo que proporcionam características organolépticas agradáveis às formulações. Além disso, muitos destes têm sido utilizados na medicina tradicional há mais de 5.000 anos com muitos propósitos - anti-inflamatórios, analgésicos, antifúngicos, antimicrobianos, antioxidantes (1,2) também para prevenir o envelhecimento da pele (3,4). Devido à sua característica lipídica, estes podem ser interessantes para o tratamento da xerose cutânea, uma condição comum nos idosos caracterizada por uma pele excessivamente seca resultante de um desequilíbrio de lípidos na camada mais superficial da pele (5,6).

No entanto, existem incertezas sobre a segurança destes produtos, uma vez que foram relatadas irritações, sensibilidade e dermatites de contacto na pele humana (7-9). É importante salientar que a maioria dos estudos de eficácia e segurança sobre a aplicação de óleos essenciais na pele foram realizados *in vitro* (utilizando linhas de células cutâneas) ou em modelos animais, utilizando múltiplas metodologias difíceis de comparar ou extrapolar para o ser humano. Assim, a escassez de estudos sobre seres humanos limita a potencial utilização de óleos essenciais como agentes fitoterapêuticos eficazes e seguros. Isto significa também que são necessários mais estudos para verificar a eficácia e a segurança destes produtos (3,10).

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, comumente conhecida como capim-limão, é uma importante planta medicinal cultivada em diferentes regiões do mundo, incluindo Portugal. O seu óleo essencial, cuja substância principal é o monoterpene citral, é amplamente utilizado para produzir fragrâncias, cosméticos, detergentes, e produtos farmacêuticos (11,12). No entanto, não existe informação científica em os efeitos das formulações contendo óleo essencial de *C. citratus* (EOCC) na pele humana. Por conseguinte, o objetivo deste estudo era avaliar os efeitos de uma formulação contendo EOCC sobre a fisiologia da pele de voluntários saudáveis.

Table 1 - Quantitative composition of EOCC-containing gel.**Tabela 1**- Composição quantitativa do gel contendo EOCC.

Component / Componente	Quantity (% w/w) / Quantidade (% m/m)
EOCC / EOCC	5
Carbopol® 940 / Carbopol® 940	1
Glycerin / Glicerina	5
Ethylenediamine tetraacetic acid / ácido etilendiamino tetra-acético	0.1
Paraben preservative solution / Solução de parabenos	3.3
Triethanolamine / Trietanolamina	q.s. to pH 4.6 ± 0.1
Distilled water / Água Destilada	q.s. to 100

EOCC: Essential oil of *Cymbopogon citratus*; q.s.: quantum satis / EOCC: Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*; q.s.: quantum satis

Material and Methods

Formulation

The essential oil obtained from aerial parts of *Cymbopogon citratus* was provided by "Cantinho das Aromáticas" (Lisbon, Portugal). The quantitative composition of the EOCC-containing gel is presented in Table 1. EOCC, glycerin (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal), disodium ethylenediaminetetraacetate (Saninter, Lisboa, Portugal), and a paraben preservative solution, made of methylparaben (6% w/w, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) and propylparaben (3% w/w, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) in propylene glycol (LABCHEM, Santo Antão do Tojal, Portugal), were mixed. The polymer (Carbopol® 940, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) was dispersed in distilled water and then allowed to hydrate and swell before the addition of the previously prepared mixture. Triethanolamine (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) was added under stirring until a viscous and homogeneous gel was obtained with a pH value of 4.6 ± 0.1. A control gel, in the absence of EOCC, was similarly prepared without the addition of the essential oil.

Chemical characterization

The essential oil was characterized by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS). GC analysis was performed using a Perkin Elmer Clarus 400 Gas Chromatograph equipped with two Flame Ionization Detectors (FID), a split-splitless injector (split ratio of 1:40), and data processing system. Two

Material e Métodos

Formulação

O óleo essencial obtido das partes aéreas de *Cymbopogon citratus* foi fornecido pela Empresa "Cantinho das Aromáticas" (Lisboa, Portugal). A composição quantitativa do gel contendo EOCC é apresentada na Tabela 1. Para obtenção do gel foi feita uma mistura de EOCC, glicerina (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal), etilendiaminotetraacetato dissódico (Saninter, Lisboa, Portugal) e solução conservante de parabenos, à base de metilparabeno (6% m/m, AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemanha) e propilparabeno (3% m/m, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) em propilenoglicol (LABCHEM, Santo Antão do Tojal, Portugal). O polímero (Carbopol® 940, José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) foi disperso em água destilada e após intumescimento deste foi adicionado a mistura previamente preparada e adicionado trietanolamina (José M. Vaz Pereira, Benavente, Portugal) sob agitação até obter um gel viscoso e homogêneo com valor de pH de 4,6 ± 0,1. Um gel controle, sem EOCC, foi preparado de forma semelhante sem a adição do óleo essencial.

Caracterização química

O óleo essencial foi caracterizado por Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC/MS). A análise por cromatografia gasosa (GC) foi realizada usando um cromatógrafo a gás Perkin Elmer Clarus 400 equipado com dois detectores de ionização de chama (FID), um injetor split-splitless (razão de split de 1:40) e

columns of different polarity were used (i) DB-1 fused-silica capillary column coated with 100% polydimethylsiloxane [(30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m thickness); J & W Scientific Inc., Rancho Cordova, CA, USA] and (ii) DB-7HT fused-silica capillary column coated with phenylmethylsilicone [(50% phenyl)- methylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm, 0.15 μ m thickness) J&W Scientific Inc.]. The oven temperature was programmed to increase from 45°C to 175°C at 3°C/min, and subsequently at 15°C/min until 300°C, at which time the temperature was held (isothermal) for 10 min. The total run time was 61 min. Hydrogen was used as carrier gas, adjusted to a linear velocity of 30 cm/s. The temperatures of the injector and detector were kept at 280°C and 290°C, respectively. The injection volume of essential oil was approximately 0.01 μ L. The percentage composition of essential oil was determined by the normalization method, without using correction factors, according to ISO 7609. Values presented correspond to the mean value of two injections.

GC-MS analysis was performed on a Clarus 600T Mass Spectrometer equipped with a DB-1 fused silica column [(100% polydimethylsiloxane, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m thickness) J & W Scientific Inc.] connected to a Perkin-Elmer Turbomass (program version 5.4.2.1617, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). The oven temperature was programmed from 45°C to 175 °C, in increments of 3 °C/min, and subsequently at 15 °C/min until 300 °C, at which time the temperature was kept isothermal for 10 min. The injector temperature was 280°C, the transfer line temperature was 280 °C, and the ionization chamber temperature was 220°C. Helium was used as carrier gas, adjusted to a linear velocity of 30 cm/s, with a flow sharing ratio of 1:40. The ionization energy was 70 eV, ionization current 60 μ A, collecting over a mass range of 40-300 a.m.u. with a 1 s scan time. The identity of the compounds was determined by comparing their retention rates, in relation to those of the n-alkanes and mass spectra, with standards synthesized in the laboratory, commercial standards, and by comparison with a library of mass spectra also developed in the laboratory.

Experimental design

The study included 12 healthy participants (8 women and 4 men; mean age 36.2 ± 16.3 years old) without any skin or other systemic diseases. Volunteers received a detailed explanation of the study and provided

sistema de processamento de dados. Foram utilizadas duas colunas de diferentes polaridades: i) Coluna capilar DB-1 de sílica fundida revestida com 100% polidimetilsiloxano [(30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m de espessura); J & W Scientific Inc., Rancho Cordova, CA, EUA]; ii) Coluna capilar de sílica fundida DB-7HT revestida com fenilmetilsilicone [(50% fenil)-metilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm, 0,15 μ m de espessura) J&W Scientific Inc.]. A temperatura do forno foi programada para subir de 45°C para 175°C a 3°C/min, e posteriormente a 15°C/min até 300°C. Uma vez atingidos 300°C, a temperatura foi mantida isotérmica por 10 min, totalizando um tempo de corrida de 61 min. Hidrogênio foi usado como gás de arraste ajustado a uma velocidade linear de 30 cm/s. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 280°C e 290°C, respectivamente. O volume de injeção do óleo essencial foi de 0,01 μ L. A composição percentual do óleo essencial foi determinada pelo método de normalização, sem uso de fatores de correção, conforme ISO 7609. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções.

A análise por GC-MS foi realizada utilizando um espectrômetro de massa Clarus 600T equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 [(100% polidimetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m de espessura) J & W Scientific Inc.] conectado ao Perkin-Elmer Turbomass (versão do programa 5.4.2.1617, Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, em incrementos de 3°C/min, e posteriormente a 15°C/min até 300°C. Ao atingir 300°C, a temperatura foi mantida isotérmica por 10 min. Temperatura do injetor e da linha de transferência foi de 280°C e a temperatura da câmara de ionização de 220°C. Gás Hélio foi usado como gás de arraste ajustado a uma velocidade linear de 30 cm/s, com uma razão de compartilhamento de fluxo 1:40. A energia de ionização foi 70 eV, corrente de ionização 60 μ A, recolhida num intervalo de massa de 40-300 a.m.u. com um tempo de varredura de 1 s. A identidade dos compostos foi determinada comparando suas taxas de retenção, em relação às dos n-alcenos e espectros de massa, com padrões sintetizados no laboratório, padrões comerciais e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa também desenvolvida no laboratório.

Desenho experimental

O estudo foi realizado com 12 participantes saudáveis (8 mulheres e 4 homens; idade média de $36,2 \pm 16,3$ anos) sem doenças de pele ou outras doenças

written informed consent. All procedures observed the principles of good clinical practice from the Helsinki Declaration and respective amendments (13) and were previously approved by the institution's Ethics Committee (approval number 04/13).

A primary cutaneous tolerance assay using the 'open-test' methodology was performed (14) for 24h before the experiments.

For the efficacy test, two areas (3 cm x 3 cm) were marked in both forearms. Applications were randomized. The trial was designed for 14 days with standardized applications (0.1 mL) using a syringe two times a day (morning and evening) at home. The formulation containing EOCC was applied in one area and the control gel (without EOCC) in the other. The study was single-blinded.

Skin functions were assessed before application of the products (D0) and at the end of the trial (D15), assessing transepidermal water loss (TEWL, Tewameter® CK electronics, Germany) a measure of the epidermal "barrier" (15), the superficial and deep hydration of the epidermis (Moisturemeter SC and Moisturemeter® Dtec, Finland) (16), the biomechanical behaviour of the skin (Cutiscan® CK electronics, Germany) expressed in terms of firmness (V1) and elasticity (V3) (17) and the assessment of skin lipids (Sebumeter SM 815, CK electronics, Germany) (18). High resolution ultrasound images (HRS, DermaScan C Cortex Technology, Denmark) were obtained at D0 and D15) (19). The color images were converted into a grey scale image for further analysis processed by software ImageJ® (NIH, Bethesda, Maryland, USA) (19). All data were obtained in a controlled environment (humidity ~ 50%, temperature 21 ± 2 °C) and participants were acclimatized for at least 30 min before starting the tests. During the study period, subjects were instructed to not apply detergents, emollients, moisturizers, or any cosmetics in the testing areas.

sistêmicas. Os voluntários receberam uma explicação detalhada do estudo e forneceram consentimento informado por escrito. Todos os procedimentos respeitaram os princípios de boa prática clínica da Declaração de Helsínquia e respetivas alterações (13) e foram aprovados pela Comissão de Ética (aprovação n.º 04/13).

A tolerância dermatológica da formulação a testar foi previamente avaliada por teste de contacto aberto (open test) (14) durante 24 horas.

Para os testes *in vivo*, foram desenhadas duas áreas (3 cm x 3 cm) no mesmo antebraço dos voluntários e as aplicações foram feitas de forma randomizada. O ensaio foi desenhado para 14 dias com aplicações padronizadas (0,1 mL da formulação) usando uma seringa 2 vezes ao dia (manhã e noite) no domicílio dos voluntários. Numa área a formulação contendo EOCC foi aplicada enquanto na outra área apenas o gel de controlo (sem EOCC). O estudo foi feito de modo mono-cego.

As funções cutâneas foram avaliadas antes da aplicação dos produtos (D0) e no final do ensaio (D15) envolvendo a medição da perda transepidermica de água (TEWL, Tewameter® CK electronics, Alemanha) uma medida da "barreira" epidérmica (15), a hidratação superficial e profunda da epiderme (Moisturemeter SC e Moisturemeter® Dtec, Finlândia) (16), o comportamento biomecânico da pele (Cutiscan® CK electronics, Alemanha) expresso em termos de firmeza (V1) e elasticidade (V3) (17) e a avaliação dos lipídeos cutâneos (Sebumeter SM 815, CK electronics, Alemanha) (18). Imagens de ultrassonografia de alta resolução (HRS, DermaScan C Cortex Twechnology, Dinamarca) foram obtidas em D0 e D15). As imagens coloridas foram convertidas em imagens em escala de cinza para posterior análise e processamento usando o Software ImageJ® (NIH, Bethesda, Maryland, EUA) (19). Todos os dados foram obtidos em ambiente com umidade e temperatura controlada (umidade ~ 50%, temperatura 21 ± 2 °C) e os participantes foram aclimatados por pelo menos 30 minutos antes de iniciar o procedimento. e analisadas usando Image J® Software (NIH, Bethesda, Maryland, USA) (19). Todos os dados foram obtidos em ambiente com umidade e temperatura controladas (umidade ~ 50%, temperatura 21 ± 2 °C) e os participantes foram aclimatados por pelo menos 30 min antes de iniciar o procedimento. Durante o período do estudo, os sujeitos foram orientados a não aplicar detergents, emolientes, hidratantes ou quaisquer cosméticos nos braços.

Statistics

Data were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM) and compared by Mann–Whitney test using GraphPadPrism 5[®] software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A *p* value <0.05 was considered significant.

Results

The chromatographic analysis of the EOCC allowed the identification of 24 compounds, accounting for 96.1% of the total oil. The main components identified in the essential oil were geranial (*trans*-citral) (42.3%) and neral (*cis*-citral) (33.2%). These data are summarized in Table 2.

Estatística

Os dados foram relatados como média \pm erro padrão da média (SEM) e comparados pelo teste de Mann-Whitney usando o software GraphPadPrism 5[®] (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Um valor de *p* $<0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

A análise cromatográfica do EOCC permitiu identificar 24 compostos, os quais constituem 96,1% do óleo total. Os principais componentes identificados no óleo essencial foram geranial (*trans*-citral) (42,3%) e neral (*cis*-citral) (33,2%). Estes dados estão resumidos na Tabela 2.

Table 2 - Chemical composition of Essential oil from *Cymbopogon citratus*.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Compound / Compostos	RI / IR	Percentage / Porcentagem
<i>trans</i> -limonene oxide / óxido de <i>trans</i> -limoneno	1112	0.2
Borneol/Borneol	1134	0.1
<i>cis</i> -Crisantemol / <i>cis</i> -Crisantemol*	1151	0.8
α -Terpineol / α -Terpineol	1159	0.2
<i>trans</i> -Carveol / <i>trans</i> -Carveol/	1189	v
Neral (<i>cis</i> -Citral) / Neral (<i>cis</i> -Citral)/	1210	33.2
Piperitone / Piperitona	1211	0.1
Geraniol / Geraniol	1236	5.4
Geranial (<i>trans</i> -Citral) / Geranial (<i>trans</i> -Citral)	1240	42.3
Geranyl formate / Formato de Geranil	1285	tr
Methyl geranate* / Geranato de metila	1288	tr
α -Cubebene / α -Cubebeno	1345	tr
Geranyl acetate / Acetato de Geranil	1370	3.2
β -Elemene / β -Elemeno	1388	tr
β - Caryophyllene / β - Caryophylleno	1414	1.4
<i>trans</i> -Isoeugenol / <i>trans</i> -Isoeugenol	1422	0.1
β -Copaene / β -Copaeno	1426	0.1
α -Humulene / α -Humuleno	1446	0.2
<i>trans</i> -Cadina-1(6)-4-diene / <i>trans</i> -Cadina-1(6)-4-dieno	1469	tr
Germacrene D / Germacreno D	1474	0.1
α -Muurolene / α -Muuroleno	1494	tr
γ -Cadinene / γ -Cadineno	1500	1.3
δ -Cadinene / δ -Cadineno	1505	0.2
β - Caryophyllene oxide / Óxido de Cariofileno	1561	tr
% Identification / % Identificação		96.1

RI: Retention Index relative to a series of C9-C16 n-alkanes; tr: trace ($<0.05\%$); *Compound identified based only on mass spectrum.
 IR: índice de retenção relative a série de C9-C16 n-alcacos; tr: traço ($<0.05\%$); *Composto identificado com base no espectro de massa

Table 3 - Transepidermal Water Loss, epidermal hydration, and sebum before and after application of the formulation containing EOCC for 14 days.**Tabela 3** - Perda de água transepidermica, hidratação epidérmica e sebo antes e após a aplicação da formulação contendo EOCC durante 14 dias.

	Site 1 (control) / Site 1 (controle)		Site 2 (treated) / Site 2 (tratado)	
	Before/Antes	After/Depois	Before/Antes	After/Depois
TEWL (g/m ² /h) / PTEA (g/m ² /h)	5.22 ± 0.46	5.82 ± 0.48	5.69 ± 0.44	4.38 ± 0.38*
Hydration SC (A.U.) / Hidratação SC (U.A.)	29.48 ± 1.61	29.22 ± 2.73	28.99 ± 1.23	35.34 ± 2.25*
Hydration Deep (A.U.) / Hidratação Profunda (U.A.)	27.04 ± 2.63	29.16 ± 1.22	26.71 ± 1.82	35.18 ± 1.54**
Cutaneous lipids (A.U.) / Lipídeos cutâneos (U.A.)	0.93 ± 0.13	0.85 ± 0.20	1.05 ± 0.23	0.40 ± 0.13*

*p < 0.05; **p < 0.01, Mann-Whitney test / *p < 0,05; **p < 0,01, Teste Mann-Whitney

The open skin tolerance test indicated that the formulation containing EOCC was well tolerated. No signs of irritation, such as erythema, dryness, edema, or itching, were observed. At any time during the 14-day treatment period.

Regarding skin parameters, a significant decrease in TEWL was observed in the site treated with the formulation containing EOCC, as well as a significant increase in superficial and deep epidermal hydration and a decrease in skin lipids (Table 3). Comparing skin biomechanical parameters revealed an increase in V1 (firmness) and V3 (elasticity) relative to the control gel (Table 4).

The High-Resolution Sonography has shown that the epidermis was more echogenic after applying the EOCC formulation, suggesting that essential oil penetrates the most superficial layers of the skin (Table 5, Figure 1).

O teste aberto de tolerância da pele revelou que a formulação contendo EOCC foi bem tolerada e não foram observados sinais de irritação, como eritema, ressecamento, edema ou prurido. Além disso, não foram observados sinais de irritação durante os 14 dias de tratamento.

Relativamente aos parâmetros cutâneos, no local tratado com a formulação contendo EOCC observou-se uma diminuição significativa em TEWL, bem como um aumento significativo na hidratação superficial e profunda da epiderme e uma diminuição dos lípidos da pele (Tabela 3). Os parâmetros biomecânicos da pele revelaram um aumento em V1 (firmeza) e V3 (elasticidade) (Tabela 4).

A Sonografia de Alta Resolução mostrou que a epiderme era mais ecogénica após a aplicação da formulação EOCC, sugerindo que o óleo essencial penetra nas camadas mais superficiais da pele (Tabela 5, Figura 1).

Table 4 - Biomechanical skin parameters before and after application of the formulation containing EOCC for 14 days.

Tabela 4 - Parâmetros biomecânicos da pele antes e após a aplicação da formulação contendo EOCC durante 14 dias.

Biomechanical parameters / Parâmetros Biomecânicos	Site 1 (control) / Site 1 (controle)		Site 2 (treated) / Site 2 (tratado)	
	Before/Antes	After/Depois	Before/Antes	After/Depois
V1 (firmness) / V1 (firmeza)	59.16 ± 6.18	61.18 ± 9.43	67.46 ± 6.92	44.81 ± 3.97*
V2 (viscoelasticity) / V2 (viscoelasticidade)	12.34 ± 2.96	7.85 ± 2.36	13.24 ± 3.76	15.29 ± 2.90
V3 (elasticity) / V3 (elasticidade)	21.77 ± 6.31	18.44 ± 5.34	17.95 ± 4.10	39.25 ± 7.04*

*p < 0.05, Mann-Whitney test / *p < 0,05 Teste Mann-Whitney

Table 5 - Variation in the epidermal echogenicity after application of the formulation containing EOCC for 14 days.

Tabela 5 - Variação da ecogenicidade epidérmica após aplicação da formulação contendo EOCC durante 14 dias.

	Epidermis Echogenic area (%) / Área ecogênica da epiderme (%)
Site 1 (control)% / Site 1 (controle)%	16.28 ± 1.70
Site 2 (EOCC treated) / Site 2 (tratado)	25.72 ± 1.60*

*p < 0.05, Mann-Whitney test / *p < 0,05 Teste Mann-Whitney

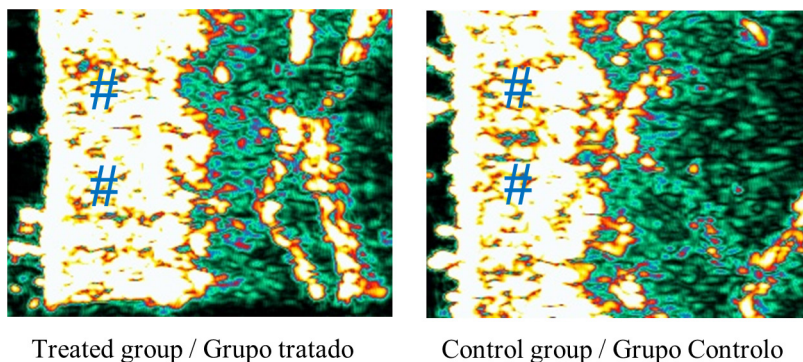


Figure 1 - Illustrative ultrasound image showing increase in epidermis echogenicity area (bright area) after the application of essential oil formulation. ## Epidermis.

Figura 1 - Imagem sonográfica ilustrativa mostrando o aumento da área de ecogenicidade da epiderme (área brilhante) após a aplicação da formulação do óleo essencial. ## Epiderme.

Discussion

In this study we investigated effects of *C. citratus* essential oil (EOCC) on skin physiology to evaluate its potential interest for use in skin care formulations. EOCC has been reported to have several benefits, including topical anti-inflammatory, antifungal (20), anxiolytic (21), anti-ulcer (22), and antihypertensive (23) effects. The main component of EOCC is the monoterpene citral, which can be found in two isomeric forms (*cis*, known as neral; or *trans*, known as geranial) (11, 24) and to which most of the beneficial effects of EOCC have been attributed (25). Chemical analysis of the essential oil used in this work revealed mostly citral in its composition. Lulekal et al. (26) reported no skin irritant effect and no systemic toxicity when a formulation containing 10% EOCC was administered to mice, suggesting that this essential oil has a good safety profile. We evaluated the safety of our formulation, which contained a lower concentration of EOCC, in human skin through the "open test" methodology. No signs of irritation or toxicity were observed after application, allowing the continuation of the experimental efficacy protocol.

Our results have shown that the application of the formulation containing EOCC significantly increased the epidermis superficial and deep hydration ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) and reduced the transepidermal water loss (TEWL) ($p < 0.05$). Water is essential for normal skin functionality, especially its outermost layer, the stratum corneum (SC). Water retention in the SC is dependent on the presence of two main factors (1) naturally occurring hygroscopic substances collectively referred to as natural moisturizing factors (NMFs), and (2) intercellular lipids organized to form a barrier that prevents transepidermal water loss (TEWL) (27). Sufficient hydration of the epidermis is necessary for the proper maturation of the EC and physiological peeling of the skin. Thus, if the water content in the epidermis falls below a critical level the enzymatic functions required for physiological peeling are impaired, and excessive adhesion of corneocytes occurs with their accumulation on the skin surface. This process leads to the appearance of dry, rough, and flaking skin (28). The inverse correlation between TEWL and skin hydration has been well demonstrated, as higher levels of TEWL, a marker of skin barrier function, are often correlated with lower water content

Discussão

Neste estudo, investigamos os efeitos do óleo essencial de *C. citratus* (EOCC) na fisiologia da pele tendo em mente o seu potencial interesse para utilização em formulações de cuidados com a pele. Foi relatado que o EOCC tem vários efeitos benéficos tais como anti-inflamatório tópico, antifúngico (20), ansiolítico (21), anti-úlceras (22), e anti-hipertensivo (23). O principal componente do EOCC é o monoterpene citral que pode ser encontrado em duas formas isoméricas (*cis*, conhecido como neral; ou *trans*, conhecido como geranial) (11, 24) e ao qual foi atribuída a maioria dos efeitos benéficos do EOCC (25). A análise química do óleo essencial utilizado neste trabalho revelou, na sua composição, sobretudo citral. Lulekal et al. (26) não reportaram qualquer efeito irritante na pele e nenhuma toxicidade sistêmica quando uma formulação contendo 10% de EOCC foi administrada a ratos, sugerindo que este óleo essencial tem um bom perfil de segurança. Avaliámos a segurança da nossa formulação na pele humana, que continha uma menor concentração de EOCC, através da metodologia do "teste aberto". Não foram observados sinais de irritação ou toxicidade após a aplicação, o que permitiu a continuação do protocolo de eficácia experimental.

Nossos resultados mostraram que a aplicação da formulação contendo EOCC aumentou significativamente a hidratação superficial e profunda da epiderme ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) e reduziu a perda de água transepidérmica (TEWL) ($p < 0,05$). A água é essencial para a funcionalidade normal da pele, especialmente para a sua camada mais externa, o stratum corneum (SC). A retenção de água na SC está dependente da presença de dois factores principais (1) substâncias higroscópicas naturais colectivamente referidas como factores hidratantes naturais (NMFs), e (2) lípidos intercelulares organizados para formar uma barreira que previne a perda de água transepidérmica (PTEA) (27). É necessária uma hidratação suficiente da epiderme para a maturação adequada da SC e peeling fisiológico da pele. Assim, se o conteúdo de água na epiderme cair abaixo de um nível crítico, as funções enzimáticas necessárias para o peeling fisiológico são prejudicadas, e ocorre uma adesão excessiva dos corneócitos com a sua acumulação na superfície da pele. Este processo leva ao aparecimento de pele seca, áspera e descamação da pele (28). A correlação inversa entre a PTEA e a hidratação cutânea foi bem demonstrada, uma vez que níveis mais elevados de PTEA, um marcador da função de barreira cutânea, estão frequentemente correlacionados com um menor

in the SC (29). Thus, the results regarding TEWL and hydration suggest that the formulation containing EOCC improves the water balance in the skin, among other factors, by increasing the barrier function of the skin leading to decreased TEWL and increasing the water content of the epidermis.

The image analysis obtained by High Resolution Sonography showed that the formulation containing EOCC significantly increases the epidermis echogenicity ($p < 0.05$), suggesting that the formulation is retained mainly in this layer of the skin, which corroborates the evidence that the lipidic character of the essential oil could combine with the lipids of the SC and increase the integrity of this structure, thus providing greater barrier integrity with a consequent decrease in TEWL. In addition, the permanence of the oil in the epidermal layer is evidence of their safety, as their effects would be restricted to the skin. Similar results have recently been described by our research group with formulations containing essential oils of *Lavandula angustifolia* Mill. (Lavender) and *Salvia officinalis* L. (Sage) (30).

The biomechanical properties of the skin were evaluated using CutiScan[®]. A significant decrease in V1 values ($p < 0.05$) and an increase in V3 values ($p < 0.05$) were observed at the site exposed to the formulation containing EOCC. V1 is related to the firmness and seems to indicate the ability of the skin to resist displacement; the firmer the skin, the lower the V1. V3 has been related to the ability of the skin to resist displacement versus its ability to return to its original position; the higher the V3, the better the elasticity (17,31). Skin firmness is related to the ability of collagen and elastic fibers to elongate and is inversely proportional to their thickness and rigidity (32). Elasticity is considered an indicator of age and overall skin health (33) and is also related to the content of collagen and elastin fibers (34,35). Thus, our results suggest that the application of the formulation containing EOCC favors the accumulation of these protein fibers in the skin and improves its biomechanical characteristics.

teor de água no SC (29). Assim, os resultados relativos à PTEA e à hidratação sugerem que a formulação contendo EOCC melhora o equilíbrio da água na pele, entre outros factores, aumentando a função de barreira da pele levando à diminuição da TEWL e aumentando o conteúdo de água da epiderme.

A análise de imagem proporcionada pela Sonografia de Alta Resolução mostrou que a formulação contendo EOCC aumenta significativamente a ecogenicidade da epiderme ($p < 0,05$), sugerindo que a formulação é retida principalmente nesta camada da pele, o que corrobora a evidência de que o óleo essencial pelo seu carácter lipídico poderia combinar-se com os lípidos do SC e aumentar a integridade desta estrutura, proporcionando assim uma maior integridade da barreira com uma consequente diminuição do PTEA. Além disso, a permanência do óleo na camada epidérmica evidencia a sua segurança, uma vez que os seus efeitos ficariam restritos à pele. Resultados semelhantes foram recentemente descritos pelo nosso grupo de investigação com formulações contendo óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* Mill. (Lavandula) e *Salvia officinalis* L. (Sage) (30).

As propriedades biomecânicas da pele foram avaliadas através do CutiScan[®]. Foram observados a diminuição significativa dos valores de V1 ($p < 0,05$) e aumento significativo dos valores de V3 ($p < 0,05$) no sítio exposto à formulação contendo EOCC. V1 está relacionado com a firmeza e parece indicar a capacidade da pele de resistir ao deslocamento; quanto mais firme é a pele, mais baixa é a V1. V3 tem estado relacionado com a capacidade da pele de resistir ao deslocamento versus a sua capacidade de voltar à sua posição original; quanto mais alto o V3, melhor a elasticidade (17,31). A firmeza da pele está relacionada com a capacidade de alongamento das fibras elásticas e de colagénio e é inversamente proporcional à sua espessura e rigidez (32). A elasticidade é considerada um indicador de idade e saúde geral da pele (33) e está também relacionada com o conteúdo das fibras de colagénio e elastina (34,35). Assim, os nossos resultados sugerem que a aplicação da formulação contendo EOCC é capaz de favorecer a acumulação destas fibras proteicas na pele e melhorar as suas características biomecânicas.

Finally, the repeated use of the formulation did not increase the lipid content of the epidermal surface. However, it is possible to speculate about the potential enhancement of these compounds on epidermal cohesion, as suggested by the previously detected effects (30,36). Regardless, there appears to be a consistent decrease in epidermal lipid content ($p < 0.05$) after repeated exposure to the EOCC-containing formulation. This additional aspect would reinforce the interest in using these compounds in skin health products (37).

Acknowledgments

This work is funded by national funds through FCT - Foundation for Science and Technology, I.P., under projects UIDB/04567/2020, UIDP/04567/2020 and UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020+LA/P/0094/2020.

Authors contribution

SFA, EP, MCC, LMR planned and performed experiments; CPL prepared the formulations; ACF has undertaken Chromatographic analysis; SFA and LMR wrote and corrected the manuscript.

Conflict of Interests

Editors involved in this manuscripts' authorship had no participation in the review or decision process. All authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

Finalmente, o uso repetido da formulação não aumentou o conteúdo lipídico da superfície epidérmica. No entanto, é possível especular sobre o potencial aumento destes compostos na coesão epidérmica, como sugerido pelos efeitos previamente detectados (30,36). Mas mesmo assim, parece haver uma diminuição consistente no teor de lípidos epidérmicos ($p < 0,05$) após exposição repetida à formulação contendo EOCC. Este aspecto adicional reforçaria o interesse na utilização destes compostos em produtos para a saúde da pele (37).

Agradecimentos

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., no âmbito dos projetos UIDB/04567/2020, UIDP/04567/2020 e UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020+LA/P/0094/2020.

Declaração de contribuições dos autores

SFA, EP, MCC, LMR planejaram e realizaram experimentos; CPL preparou as formulações; ACF realizou as análises cromatográficas; SFA e LMR redigiram e corrigiram o manuscrito.

Conflito de interesses

Os editores envolvidos na autoria deste manuscrito não participaram do processo de revisão ou decisão. Todos os autores afirmam que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. Guzmán, E., & Lucia, A. (2021). Essential Oils and Their Individual Components in Cosmetic Products. *Cosmetics*, 8(4), 114. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040114>
2. Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), 1100–1110. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>
3. Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M., Ademiluyi, A., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S., & Iriti, M. (2017). Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules*, 22(1), 70. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>
4. Orchard, A., & van Vuuren, S. (2017). Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–92. <https://doi.org/10.1155/2017/4517971>
5. Augustin, M., Wilsmann-Theis, D., Körber, A., Kerscher, M., Itschert, G., Dippel, M., & Staubach, P. (2019). Diagnosis and treatment of xerosis cutis – a position paper. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 17(S7), 3–33. <https://doi.org/10.1111/ddg.13906>
6. Rosário, M. S. d., Gauto, M. I. R., Silva, A. C. L. N., Sales, J. S., Pereira, F. d. S., Santos, E. P. d., Júnior, E. R., & Costa, M. C. P. (2021). Estudo de estabilidade de emulsão cosmética com potencial de creme hidratante para o tratamento da xerose cutânea utilizando o óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius)/ Study of stability of cosmetic emulsion with potential of hydrating cream for the treatment of cutaneous xerosis using babassu oil (*Orbignya phalerata* Martius). *Brazilian Journal of Development*, 7(3), 29552–29570. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-596>
7. Sarkic, A., & Stappen, I. (2018). Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics—A Critical Review. *Cosmetics*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010011>
8. Plant, R. M., Dinh, L., Argo, S., & Shah, M. (2019). The Essentials of Essential Oils. *Advances in Pediatrics*, 66, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2019.03.005>
9. Fuentes, C., Fuentes, A., Barat, J. M., & Ruiz, M. J. (2021). Relevant essential oil components: a minireview on increasing applications and potential toxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 31(8), 559–565. <https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1940408>
10. Maurya, A. K., Mohanty, S., Pal, A., Chanotiya, C. S., & Bawankule, D. U. (2018). The essential oil from *Citrus limetta* Risso peels alleviates skin inflammation: In-vitro and in-vivo study. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.018>
11. Ekpenyong, C. E., Akpan, E., & Nyoh, A. (2015). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(5), 321–337. [https://doi.org/10.1016/s1875-5364\(15\)30023-6](https://doi.org/10.1016/s1875-5364(15)30023-6)
12. Majewska, E., Kozłowska, M., Gruczyńska-Sękowska, E., Kowalska, D., & Tarnowska, K. (2019). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil: Extraction, Composition, Bioactivity and Uses for Food Preservation – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 327–341. <https://doi.org/10.31883/pjfn/113152>
13. World Medical Association Declaration of Helsinki. (2013). *JAMA*, 310(20), 2191. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
14. Meloni, M., & Berardesca, E. (2001). The Impact of COLIPA Guidelines for Assessment of Skin Compatibility on the Development of Cosmetic Products. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2(2), 65–68. <https://doi.org/10.2165/00128071-200102020-00002>
15. Pinnagoda, J., Tupkek, R. A., Agner, T., & Serup, J. (1990). Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis*, 22(3), 164–178. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1990.tb01553.x>
16. Mayrovitz, H. N., & Luis, M. (2010). Spatial variations in forearm skin tissue dielectric constant. *Skin Research and Technology*, 16(4), 438–443. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2010.00456.x>
17. Rosado, C., Barbosa, R., Fernando, R., Antunes, F., & Rodrigues, L. M. (2015). Study of the effect of epidermal overhydration by occlusion, on the skin biomechanical behaviour assessed *in vivo* with the systems Cutometer®, Reviscometer® and CutiScan®. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 12(2), 203–213. <https://doi.org/10.19277/bbr.12.2.117>
18. Crowther, J. M. (2015). Method for quantification of oils and sebum levels on skin using the Sebumeter®. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(2), 210–216. <https://doi.org/10.1111/ics.12258>
19. Seidenari, S., Nakijo, A. D., Pepe, P., & Giannetti, A. (1991). Ultrasound B scanning with image analysis for assessment of allergic patch test reactions. *Contact Dermatitis*, 24(3), 216–222. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1991.tb01701.x>
20. Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. (2014). Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan Journal of Medicine*, 9(1), 25431. <https://doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>
21. Mendes Hacke, A. C., Miyoshi, E., Marques, J. A., & Pereira, R. P. (2020). Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 113036. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113036>
22. Venzon, L., Mariano, L. N. B., Somensi, L. B., Boeing, T., de Souza, P., Wagner, T. M., Andrade, S. F. d., Nesello, L. A. N., & da Silva, L. M. (2018). Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.020>
23. Moreira, F. V., Bastos, J. F. A., Blank, A. F., Alves, P. B., & Santos, M. R. V. (2010). Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 904–909. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2010005000012>
24. Hagvall, L., & Bråred Christensson, J. (2014). Cross-reactivity between citral and geraniol - can it be attributed to oxidized geraniol? *Contact Dermatitis*, 71(5), 280–288. <https://doi.org/10.1111/cod.12293>
25. Sharma, S., Habib, S., Sahu, D., & Gupta, J. (2020). Chemical Properties and Therapeutic Potential of Citral, a Monoterpene Isolated from Lemongrass. *Medicinal Chemistry*, 17(1), 2–12. <https://doi.org/10.2174/1573406416666191227111106>
26. Lulekal, E., Tesfaye, S., Gebrechristos, S., Dires, K., Zenebe, T., Zegeye, N., Feleke, G., Kassahun, A., Shiferaw, Y., & Mekonnen, A. (2019). Phytochemical analysis and evaluation of skin irritation, acute and sub-acute toxicity of *Cymbopogon citratus* essential oil in mice and rabbits. *Toxicology Reports*, 6, 1289–1294. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.002>
27. Verdier-Sévrain, S., & Bonté, F. (2007). Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6(2), 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x>
28. Watkinson, A., Harding, C., Moore, A., & Coan, P. (2001). Water modulation of stratum corneum chymotryptic enzyme activity and desquamation. *Archives of Dermatological Research*, 293(9), 470–476. <https://doi.org/10.1007/s004030100257>
29. Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
30. de Andrade, S. F., Rijo, P., Rocha, C., Zhu, L., & Rodrigues, L. M. (2021). Characterizing the Mechanism of Action of Essential Oils on Skin Homeostasis—Data from Sonographic Imaging, Epidermal Water Dynamics, and Skin Biomechanics. *Cosmetics*, 8(2), 36. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020036>

31. Monteiro Rodrigues, L., & Fluhr, J. W. (2019). EEMCO Guidance for the *in vivo* Assessment of Biomechanical Properties of the Human Skin and Its Annexes: Revisiting Instrumentation and Test Modes. *Skin Pharmacology and Physiology*, 33(1), 44–60. <https://doi.org/10.1159/000504063>
32. Akhtar, N., Zaman, S. U., Khan, B. A., Amir, M. N., & Ebrahimzadeh, M. A. (2011). Calendula extract: effects on mechanical parameters of human skin. *Acta poloniae pharmaceutica*, 68(5), 693–701.
33. Kim, M. A., Kim, E. J., & Lee, H. K. (2018). Use of SkinFibrometer® to measure skin elasticity and its correlation with Cutometer® and DUB® Skinscanner. *Skin Research and Technology*, 24(3), 466–471. <https://doi.org/10.1111/srt.12455>
34. Ray, S., Adelnia, H., & Ta, H. T. (2021). Collagen and the effect of poly-l-lactic acid based materials on its synthesis. *Biomaterials Science*, 9(17), 5714–5731. <https://doi.org/10.1039/d1bm00516b>
35. Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 25(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>
36. Makrantonaki, E., Ganceviciene, R., & Zouboulis, C. C. (2011). An update on the role of the sebaceous gland in the pathogenesis of acne. *Dermato-Endocrinology*, 3(1), 41–49. <https://doi.org/10.4161/derm.3.1.13900>
37. Maia Campos, P. M. B. G., Melo, M. O., & Mercurio, D. G. (2019). Use of Advanced Imaging Techniques for the Characterization of Oily Skin. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00254>