

## **Valutazione della funzionalità cosmetica mediante studi di assorbimento percutaneo, di spettrofotometria di riflettanza e di bioadesività.**

---

Francesco Bonina , Dipartimento di Scienze Farmaceutiche-Università di Catania  
Viale A. Doria 6, 95125, boninaf@unict.it

### 1. La spettrofotometria di riflettanza nel monitoraggio del processo melanogenetico.

#### *1.1 Introduzione*

Da recente, una considerevole attenzione è stata rivolta da parte di molti ricercatori all'utilizzazione di metodiche non invasive per la determinazione della quantità di melanina presente nella pelle. Tra le differenti tecniche proposte a tale scopo, la colorimetria e la spettrofotometria di riflettanza costituiscono sicuramente quelle di maggior interesse. Con la "skin reflectance colorimetry" il grado di pigmentazione cutanea viene determinato utilizzando la semplice correlazione, peraltro non ancora del tutto confermata, tra uno o più parametri colorimetrici (L, a, b) del sistema CIE Lab e la quantità di melanina presente nella pelle. Mediante la spettrofotometria di riflettanza è possibile determinare, dallo spettro di riflettanza, un indice di melanina (IM) direttamente ed inequivocabilmente correlabile con la quantità di questo cromoforo presente nella pelle.

In base a quanto detto, la spettrofotometria di riflettanza si pone quindi come un'interessante e non invasiva tecnica in grado di valutare gli effetti di un prodotto cosmetico sulla modulazione del processo melanogenetico.

In questa comunicazione verranno illustrati i risultati ottenuti nella valutazione della capacità depigmentante di due formulazioni cosmetiche, una contenente il 3% di acido Kogico (KOG) ed un'altra il 3% di una particolare miscela di estratti vegetali SM (estratto di ulivo, di riso, di arance rosse e di capperi) dotata di attività depigmentante.

Per effettuare la sperimentazione sono stati impiegati 18 volontari sani.

#### *1.2 Metodologia e protocollo sperimentale.*

La valutazione della capacità depigmentante è stata effettuata mediante l'utilizzo della spettrofotometria di riflettanza ed in particolare impiegando uno strumento X-Rite mod.968. Lo strumento è stato calibrato secondo uno standard di bianco conforme a quanto previsto dal National Bureau of Standards utilizzando una sorgente di illuminazione C ed un angolo di osservazione di 2°.

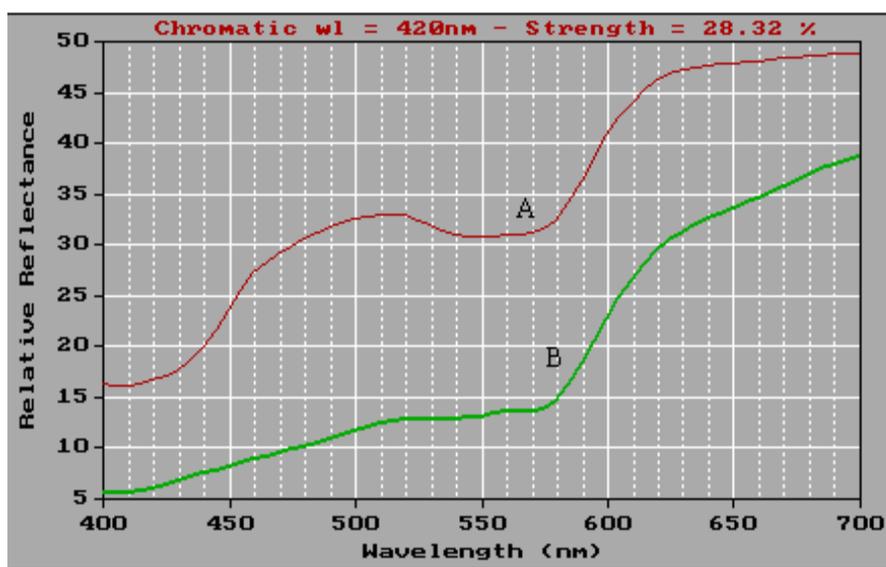
Nella Fig.1 viene riportato lo spettro di riflettanza (curva A) della pelle di un soggetto prima di una intensa esposizione solare (pelle non abbronzata) : in questa curva è possibile osservare soprattutto i picchi di assorbimento (420-430; 530-580) del cromoforo emoglobina presente nella pelle. Sempre nella Fig.1 viene riportata la curva B riferita allo stesso soggetto dopo un lungo periodo di esposizione alle radiazioni solari (pelle abbronzata) : in questo caso è possibile osservare che i picchi di assorbimento dovuti alla emoglobina sono stati oscurati dal forte assorbimento della melanina. Lo spettro di riflettanza della melanina infatti è caratterizzato da un forte assorbimento nella regione UV mentre nel visibile si verifica un assorbimento che decresce in modo continuo da 450 nm a 700nm. Inoltre, nella regione dello spettro che va da 650 nm a 700 nm l'emoglobina non presenta picchi di assorbimento mentre la melanina continua ad avere un apprezzabile assorbimento. Quindi, in base a queste evidenze e sfruttando le caratteristiche di riflettanza della pelle nella regione 650 nm - 700 nm, diversi ricercatori hanno proposto un indice di melanina (IM) che si basa sulla seguente formula:

$$IM = LIR\ 650 - LIR\ 700 + 0.015$$

dove LIR è il logaritmo dell'inverso della riflettanza misurata con uno spettrofotometro di riflettanza rispettivamente a 650 ed a 700 nm, mentre 0.015 è un fattore di correzione che dipende dallo strumento. Il valore IM misura la pendenza (slope) della retta tra 650 e 700 ed è in grado di dare, mediante una misura rapida e non invasiva, una determinazione semiquantitativa della melanina presente nella pelle senza risentire della presenza del cromoforo emoglobina.

Nella Fig. 1 è possibile evidenziare abbastanza bene la differente pendenza dello spettro nella regione 650-700 nm prima dell'abbronzatura (A) e dopo il processo di abbronzatura (B).

Fig. 1 Spettri di riflettanza della pelle prima e dopo l'induzione del processo melanogenetico.



Per valutare l'efficacia delle formulazioni da testare, in ciascun soggetto è stata indotta la pigmentazione cutanea mediante esposizione UV (solar light) e quindi, dopo applicazione delle formulazioni, è stato monitorato il processo melanogenetico con la spettrofotometria di riflettanza.

In particolare la valutazione è stata effettuata monitorando nel tempo le variazioni dell'indice di melanina nei siti cutanei esposti alla "solar light" e trattati con le formulazioni KOG o SM e non trattati (Controllo).

Inizialmente, in ciascuno dei 18 volontari, impiegati nella sperimentazione, sono stati demarcati sei siti cutanei della zona centrale dell'avambraccio (tre per ciascun avambraccio). Questi siti, sui quali è stato determinato il valore iniziale di IM, sono stati sottoposti per una settimana ad un protocollo di esposizione controllata utilizzando una opportuna lampada che simula la luce solare (solar light). L'esposizione dei soggetti alla "solar light" è stata effettuata con tempi di esposizione personalizzati per ciascun soggetto e comunque tali da sviluppare, in ciascuno di essi, una pigmentazione cutanea apprezzabile sia visivamente che strumentalmente.

Qui di seguito viene riportato lo schema di esposizione alla "solar light" che è stato utilizzato per il processo di abbronzatura controllata:

1° e 2° giorno: esposizione da 2 a 4 minuti (in funzione del soggetto);

3° riposo;

4° e 5° giorno: esposizione da 4 a 6 minuti (in funzione del soggetto);

6° riposo

7° e 8° giorno: esposizione da 6 a 8 minuti (in funzione del soggetto).

I giorni di riposo sono necessari per prevenire risposte eritematogene (ed eventuale "peeling") che potrebbero alterare la misurazione dell'indice di melanina.

Dopo esposizione alla "solar light", alcuni siti cutanei (due, uno per ciascun avambraccio) sono stati utilizzati come controllo e quindi non trattati con alcuna formulazione mentre su gli altri siti sono state applicate le formulazioni da testare (due siti per ciascuna formulazione, un sito per ciascun avambraccio).

Durante i primi otto giorni (periodo di esposizione), dopo ciascuna esposizione UV venivano applicate, sui siti cutanei da trattare, le formulazioni in esame mentre nei giorni successivi (altre 3 settimane) i soggetti hanno applicato giornalmente (una volta al giorno) le due formulazioni contrassegnate con le lettere A e B per facilitare l'applicazione nei siti che venivano contrassegnati con le stesse lettere.

Il monitoraggio del grado di pigmentazione cutanea è stato effettuato, per complessive 4 settimane, determinando per ciascun sito le variazioni dell'indice di melanina nel tempo ed ottenendo delle curve  $\Delta$ IM-tempo (vedi Fig 2).

Per quantificare l'effetto depigmentante sono stati calcolati i valori delle aree sottese dalle curve  $\Delta$ IM-tempo (AUC) e da questi le percentuali di inibizione del processo di melanogenesi (PIP- percentuale di inibizione della pigmentazione) mediante la seguente formula:

$$PIP = \frac{AUC_C - AUC_T}{AUC_C} \times 100$$

dove  $AUC_C$  rappresenta il valore delle aree sottese dalle curve ottenute riportando la variazione dell'indice di melanina  $\Delta$ IM in funzione del tempo (periodo di monitoraggio 4 settimane) per i siti controllo (siti esposti alla lampada "solar light" ma non trattati con le formulazioni da testare) mentre  $AUC_T$  rappresenta il valore delle aree sottese dalle curve  $\Delta$ IM- tempo per i siti esposti alla lampada e successivamente trattati con i prodotti da testare.

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata usando il metodo t-test di Student.

### 1.3 Risultati

Nella Fig. 2 è possibile osservare un tipico decorso delle curve  $\Delta$ .I.M-tempo ottenute per i siti cutanei trattati con le formulazioni KOG e SM e non trattati (Controllo).

Entrambe le formulazione, KOG e SM, si sono dimostrate efficaci nell'inibire il processo di pigmentazione indotto in volontari sani mediante esposizione a radiazioni UV.

Come è possibile osservare dalla Fig.3, i siti cutanei trattati con le formulazioni in esame presentano una pigmentazione di minore intensità e durata rispetto a quella registrata per i siti cutanei non trattati (Controllo).

Nella Tab.1 vengono riportati sia i valori medi delle aree sottese dalle curve  $\Delta$ .I.M-tempo (AUC), che risultano direttamente proporzionali all'intensità ed alla durata della pigmentazione, che le percentuali di inibizione della pigmentazione (P.I.P.) ottenuti con le formulazioni in esame.

Come è possibile osservare dai valori riportati in Tab.1, il valore di AUC relativo ai siti trattati con la formulazione contenente l'estratto SM risulta significativamente inferiore a quello ottenuto con formulazione KOG ( $p < 0.01$ ) dimostrando in tal modo un'efficacia depigmentante superiore a quella ottenuta mediante trattamento con acido kogico.

Quantificando l'effetto di inibizione del processo melanogenetico delle formulazioni studiate mediante il calcolo dei valori delle percentuali di inibizione della pigmentazione (PIP) (vedi Tab.1), sono stati ottenuti valori del P.I.P. di 45.8 % per la formulazione KOG e del 65.8 % per la formulazione SM.

Tab. 1 Valori medi delle AUC (aree sottese sotto le curve  $\Delta$ .I.M.-tempo) e delle percentuali di inibizione della pigmentazione (P.I.P.) ottenute con le formulazioni KOG ed SM.

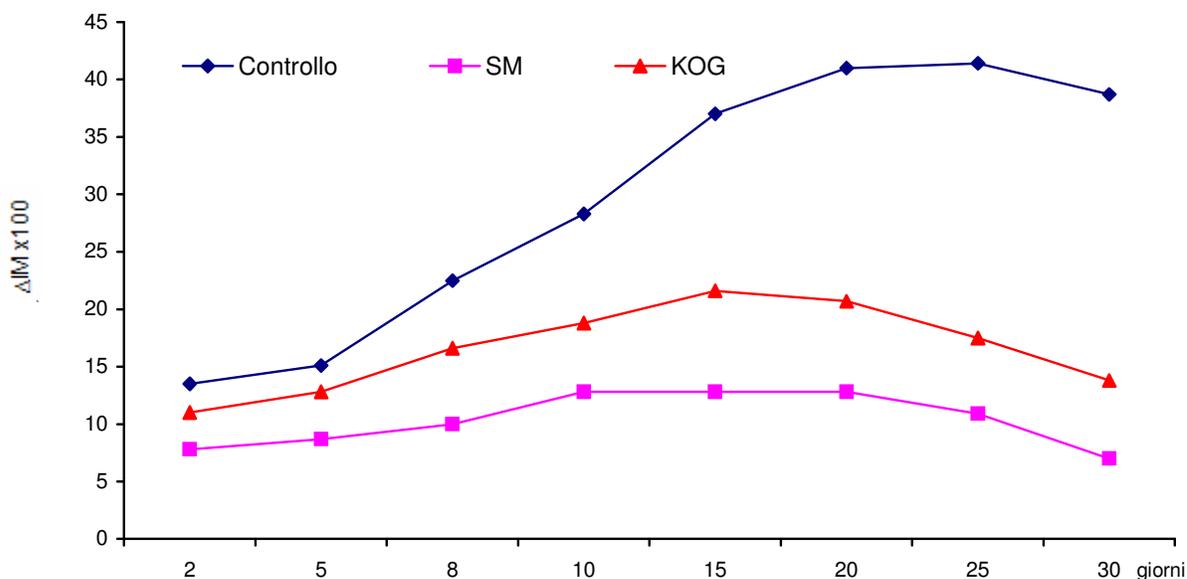
	CONTROLLO	KOG	SM
Valori medi di AUC $\pm$ SD	898.0 $\pm$ 102.5	486.3 $\pm$ 58.4	307.5 $\pm$ 45.6
Valori medi di P.I.P	-----	45.8 %	65.8%

n = 18

Controllo versus KOG :  $p < 0.01$

KOG versus SM :  $p < 0.01$

Fig.2 Variazioni tipiche dell'indice di melanina ( $\Delta$ .I.M.) x 100 in funzione del tempo (giorni) ottenute, dopo induzione del processo di pigmentazione cutanea, per i siti cutanei trattati con le formulazioni KOG e SM e per i siti non trattati (Controllo).



## 2. Valutazione mediante spettrofotometria di riflettanza dell'effetto protettivo nei confronti dei danni cutanei indotti da radiazioni ultraviolette.

### *2.1 Introduzione*

L'eritema cutaneo indotto da radiazioni UVB è considerato un buon modello per valutare i danni prodotti alla pelle da esposizione alle radiazioni solari.

Gli studi riportati in letteratura descrivono sia i danni acuti (eritema cutaneo), conseguenti ad una esposizione acuta della pelle alle radiazioni UV, che gli altri processi degenerativi (photoaging, carcinogenesi etc.) causati da lunghe e protratte esposizioni cutanee a queste radiazioni.

In questa sperimentazione è stata valutata, su 18 volontari sani, l'efficacia di alcune formulazioni cosmetiche (emulsione O/A) contenenti sostanze antiossidanti e lenitive alla concentrazione del 3% (bisabolo-BIS, allantoina-AL, estratto di foglie di ulivo-UL, vitamina E acetato-VITE) in grado di inibire l'eritema cutaneo indotto dalle radiazioni UVB e conseguentemente i danni, sia acuti che cronici, che la pelle può subire in seguito ad eccessive esposizioni al sole.

Per una più obiettiva e quantitativa valutazione, il decorso eritematogeno è stato monitorato mediante una tecnica non invasiva come la spettrofotometria di riflettanza.

### *2.2 Metodologia e protocollo sperimentale*

L'eritema cutaneo è stato indotto mediante una lampada ultravioletta Mod. UVM-57 (UVP, San Gabriel, CA) in grado di emettere radiazioni nell'intervallo 290-320 nm con picco a 302 nm.

Per ciascun soggetto è stata preliminarmente determinata la minima dose eritematogena (MED) e quindi individuati e demarcati, sulla parte centrale dell'avambraccio, dieci siti cutanei (cinque per ogni avambraccio) che venivano irradiati, con tempi di esposizione pari al doppio della MED di ciascun soggetto, mediante lampada UVB.

Dopo l'irradiazione UVB, due siti cutanei sono stati utilizzati come controllo e quindi non trattati con alcuna formulazione, mentre su gli altri otto siti cutanei venivano applicate le quattro formulazioni da testare (due siti per ciascuna formulazione, uno per ciascun avambraccio).

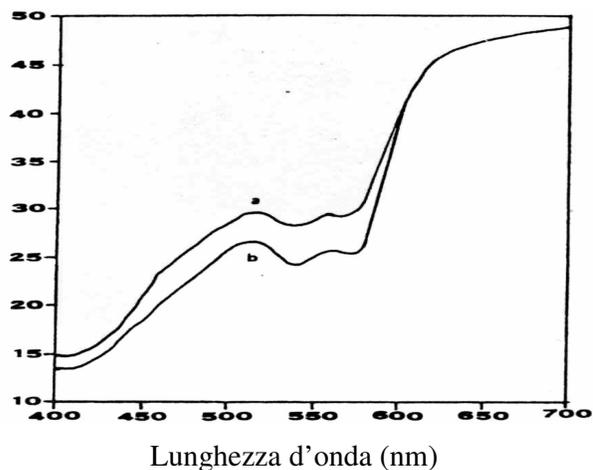
Tutti i prodotti sono stati applicati sui siti cutanei mediante apposite camere (Hill Top Chambers - Hill Top, Cincinnati, OH) per un periodo di 2 ore.

Trascorso il periodo di trattamento (2 ore), ciascun sito trattato, dopo rimozione delle Hill Top Chambers, è stato lavato con acqua per eliminare i residui delle formulazioni e l'eritema è stato monitorato per le successive 46 ore con uno spettrofotometro di riflettanza X-Rite mod.968.

Lo spettrofotometro di riflettanza era connesso con un personal computer che, mediante un software fornito in dotazione con lo strumento (Spectrostart), era in grado di elaborare gli spettri di riflettanza della pelle nella regione 400-700 nm.

Nella Fig.3 sono riportati gli spettri di riflettanza relativi allo stesso sito cutaneo prima (curva a) e dopo (curva b) l'esposizione alle radiazioni UVB. Come è possibile constatare dalla curva b, lo spettro di riflettanza del sito cutaneo dopo esposizione alle radiazioni UVB mostra due bande di assorbimento: una singola vicino 400 nm e l'altra doppia compresa 540 e 580, relativi all'assorbimento dell'emoglobina.

Fig. 3. Spettri di riflettanza della pelle ottenuti prima (curva a) e dopo esposizione a radiazioni UVB (curva b).



Dai dati spettrali, forniti dallo strumento, è stato possibile calcolare nel tempo, per ciascun sito cutaneo ed utilizzando l'equazione sotto riportata, il valore dell'indice di eritema (I.E.), che rappresenta un importante parametro per monitorare quantitativamente l'eritema cutaneo.

$$I.E. = 100 \left[ \log \frac{1}{R_{560}} + 1,5 \left( \log \frac{1}{R_{540}} + \log \frac{1}{R_{580}} \right) - 2 \left( \log \frac{1}{R_{510}} + \log \frac{1}{R_{610}} \right) \right]$$

In questa equazione vengono sommati i valori dei logaritmi del reciproco della riflettanza di quelle lunghezze d'onda (540, 560, 580) alle quali si verificano picchi di assorbimento dell'emoglobina mentre vengono sottratti i corrispondenti valori delle lunghezze d'onda (510 e 610) il cui assorbimento è dovuto principalmente alla presenza della melanina.

I valori di base dell'I.E., determinati per ciascun sito prima dell'esposizione alle radiazioni UVB sono stati sottratti ai valori di I.E., calcolati ai differenti tempi per lo stesso sito, ottenendo in tal modo delle curve tipiche ( $\Delta I.E.$ - tempo) (vedi Fig 4). mediante le quali sono state calcolate le corrispondenti aree sottese (AUC). I valori delle AUC rivestono particolare importanza nella valutazione dell'eritema in quanto risultano direttamente proporzionali all'intensità ed alla durata dell'eritema stesso.

Pertanto, per meglio valutare l'efficacia delle singole formulazioni, utilizzando la formula sotto riportata, è stata calcolata, per ciascuna formulazione testata, la percentuale di inibizione dell'eritema (P.I.E.).

$$P.I.E.\% = \frac{AUC_{(C)} - AUC_{(T)}}{AUC_{(C)}} \times 100$$

Le AUC rappresentano le aree sotto la curva  $\Delta I.E.$ -tempo dei siti trattati [ $AUC_{(T)}$ ] o dei siti controllo [ $AUC_{(C)}$ ]. L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata usando il metodo t-test di Student.

### 2.3 Risultati

La Fig.4 mostra alcune curve tipiche ottenute riportando le variazioni dell'indice di eritema in funzione del tempo sia per i siti non trattati (controllo) che per quelli trattati con le quattro formulazioni testate.

Dall'andamento del decorso eritematogeno, riportato nella Fig.4, risulta abbastanza evidente il differente effetto inibitorio esercitato dalle formulazioni testate nei confronti dell'eritema indotto dalle radiazioni UV B.

Nella Tab.2 sono riportati i valori medi di AUC, significativamente differenti tra di loro ( $p < 0.01$ ), ottenuti dalle rispettive curve  $\Delta$ I.E - tempo, per le differenti formulazioni ed i corrispondenti valori di percentuale di inibizione (P.I.E.).

I valori di AUC risultano proporzionali alla intensità ed alla durata dell'eritema indotto da UVB ed inversamente proporzionale alla capacità delle formulazioni di inibire l'effetto eritematogeno.

Dai valori di AUC risulta evidente che la formulazione contenente l'estratto di foglie di ulivo (OLI) è stata in grado di esercitare un notevole effetto inibitorio, seguita dalle formulazioni BIS e AL mentre quella contenente la vitamina E acetato ha manifestato soltanto una modesta protezione nei confronti del processo infiammatorio UV-indotto.

Per meglio evidenziare quanto sopra esposto, nella Fig.5 sono riportati i valori della percentuale di inibizione dell'eritema (P.I.E.) ottenuti con le formulazioni testate.

Tab. 2 Valori medi delle AUC (aree sottese sotto le curve  $\Delta$ I.E.-tempo) e delle percentuali di inibizione dell'eritema cutaneo UV-indotto (P.I.E.) ottenute con le differenti formulazioni e per il controllo.

	<i>Controllo</i>	<i>VITE</i>	<i>AL</i>	<i>BIS</i>	<i>OLI</i>
<b>Valori medi di AUC <math>\pm</math> SD</b>	1245.7 $\pm$ 148.7	1056.4 $\pm$ 112.3	850.7 $\pm$ 95.2	710.2 $\pm$ 84.3	413.5 $\pm$ 52.8
<b>P.I.E</b>		15.2 %	31.7 %	49.8 %	66.8 %

n = 18

Controllo versus VITE :  $p < 0.01$ ; VITE versus AL:  $p < 0.01$ ; AL versus BIS:  $p < 0.01$ ;  
BIS versus OLI :  $p < 0.01$ .

Fig.4 Variazioni dei valori di I.E. (Indice di eritema) in funzione del tempo ottenuti, dopo esposizione alle radiazioni UVB, per i siti cutanei non trattati (Controllo) o trattati con le formulazioni, AL (allantoina) e BIS (Bisabololo), VITE (vitamina E acetato), OLI (estratto di foglie di ulivo).

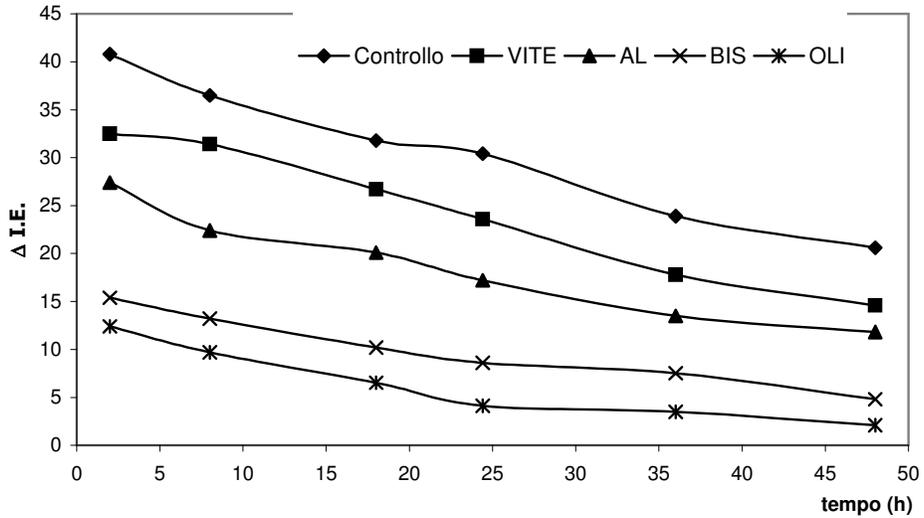
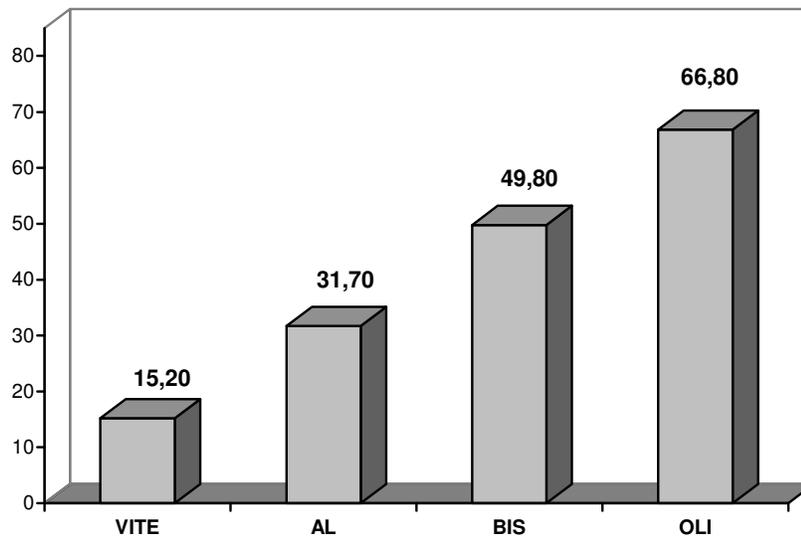


Fig.5 Valori delle percentuali di inibizione dell'eritema (P.I.P.) cutaneo indotto da UVB ottenuti con le formulazioni VITE (vitamina E acetato), OLI (estratto di foglie di ulivo), AL (Allantoina) e BIS (Bisabololo).



### 3. Valutazione di prodotti cosmetici a cessione controllata mediante studi di assorbimento percutaneo e di spettrofotometria di riflettanza.

#### *3.1. Introduzione*

La formulazione di prodotti cosmetici in grado di rilasciare gli ingredienti attivi in maniera controllata e protratta nel tempo, ha suscitato negli ultimi anni un notevole interesse da parte dei ricercatori del settore. Diversi sono i vantaggi che si attribuiscono ad un cosmetico a cessione controllata come ad es. una più razionale utilizzazione dell'attivo insieme ad una prolungata "copertura" cosmetica in grado di rendere il prodotto efficace per un maggior periodo di tempo. Inoltre un profilo di cessione ritardata e controllata nel tempo può risultare determinante per prodotti cosmetici contenenti ingredienti attivi che subiscono un elevato e rapido metabolismo cutaneo (ad es. alcune vitamine od alcuni radical scavengers): questi prodotti infatti, se formulati con veicoli convenzionali, potrebbero risultare efficaci per un breve periodo di tempo. Nonostante numerosi ricercatori attribuiscono profili di cessione controllata a diversi sistemi (liposomi, ciclodestrine, emulsioni multiple, microemulsioni, nanoparticelle etc.) ed i messaggi di marketing che rivendicano queste caratteristiche siano diventati sempre più frequenti, pochi lavori si riscontrano in letteratura in grado di dimostrare sia in vitro, ma soprattutto in vivo, cinetiche di rilascio controllato di ingredienti cosmetici.

Per un prodotto cosmetico, l'utilizzo di un sistema di rilascio controllato può essere finalizzato al raggiungimento di vari obiettivi:

- lento rilascio di un ingrediente all'interno della stessa formulazione (conservanti);
- cessione graduale dell'attivo alla superficie della pelle (strato corneo) per sostanze che debbono svolgere un'azione superficiale (idratazione del corneo, deodorazione, antisettici etc.);
- rilascio graduale dell'ingrediente attivo negli strati cutanei più profondi (epidermide viva, derma) come nel caso di antiaging, depigmentanti etc..

Le "Solid Lipid Nanoparticles" o SLN sono degli innovativi carriers nanodimensionali che si pongono come valida alternativa a più tradizionali sistemi di trasporto (liposomi, nanoparticelle polimeriche e le microemulsioni). In particolare questi sistemi particellari sono caratterizzati da dimensioni inferiori al micron (50-800 nm) e da una scarsa tossicità in quanto costituiti prevalentemente da lipidi solidi biocompatibili.

In questa comunicazione sono illustrati i risultati della valutazione del profilo di cessione controllata di formulazioni contenenti SLN "caricate" con acido glicirretico, un ingrediente ad effetto lenitivo-antiinfiammatorio utilizzato nei prodotti cosmetici.

Sono state esaminate le seguenti formulazioni:

form. A : SLN contenenti acido glicirretico in veicolo viscosizzato;

form. B : SLN vuote con acido glicirretico libero in veicolo viscosizzato;

form.C : acido glicirretico in veicolo viscosizzato.

Per evidenziare il profilo di cessione controllata dalle formulazioni contenenti l'attivo all'interno delle SLN, sono state valutate le cinetiche di permeazione cutanea in vitro e l'effetto antinfiammatorio in vivo nei confronti dell'eritema cutaneo, indotto da esposizione alle radiazioni UVB e monitorato mediante spettrofotometria di riflettanza.

Per quanto concerne gli esperimenti di assorbimento percutaneo in vitro, un sistema in grado di impartire un profilo di cessione controllata deve determinare, rispetto alla formulazione nella quale il principio attivo risulta "libero", una opportuna cinetica di permeazione che, rallentando il flusso dell'attivo attraverso la pelle, sia in grado di cedere l'attivo in un maggiore intervallo di tempo.

Per quanto riguarda la valutazione in vivo dell'effetto di cessione controllata, occorre precisare che l'attività antinfiammatoria esercitata da questo ingrediente (acido glicirretico), dopo applicazione cutanea, risulta dipendente dal profilo con cui esso è stato rilasciato dal veicolo: infatti formulazioni in grado di cedere rapidamente l'attivo consentiranno una "copertura" antinfiammatoria nel breve

periodo (qualche ora dall'applicazione) mentre veicoli in grado di rilasciare l'attivo con un profilo controllato nel tempo potranno assicurare una "copertura" antinfiammatoria più prolungata.

### *3.2 Metodologia e parte sperimentale*

#### *3.2.1 Preparazione delle SLN*

Le SLN sono state preparate impiegando il metodo degli ultrasuoni. 240 mg di acido glicirretico sono stati aggiunti al Compritol 888 ATO (4 g) fuso a 85°C contenente il Miglyol 812 (1,52 g). La fase lipidica così ottenuta viene fatta gocciolare in 108 ml di una soluzione acquosa di Pluronic F68 (2.7% p/v), mantenuta alla stessa temperatura. La pre-emulsione così ottenuta viene agitata con un turbomixer da banco (Silverson Machines LTD Waterside, Chesham Bucks) per 15 minuti, verificando che la temperatura durante tale processo si mantenga a 85°C. Essa viene successivamente sottoposta all'azione degli ultrasuoni per 15 minuti, impiegando un sistema ad alta efficienza (UP 400 S, Ultraschallprozessor, dr.Hielscher) che garantisce una elevata intensità di propagazione delle onde sonore. L'emulsione ottenuta viene raffreddata in bagno di ghiaccio mantenendola sotto costante agitazione magnetica e quindi diluita fino a 200 ml con acqua ultrafiltrata. Al fine di ottenere maggiori informazioni sui profili di rilascio dell'acido glicirretico dalle SLN sono state preparate tre diverse formulazioni (A-C): **A** (SLN contenenti acido glicirretico in veicolo viscosizzato), **B** (SLN vuote con acido glicirretico libero in veicolo viscosizzato) e **C** (acido glicirretico in veicolo viscosizzato). Tutte le formulazioni oggetto di studio sono state viscosizzate utilizzando una dispersione acquosa di glicerolo e xanthan gum precedentemente posta in agitazione a 1000 rpm per circa 5 minuti.

#### *3.2.2 Valutazione dell'assorbimento per cutaneo in vitro.*

Per la valutazione del grado di assorbimento percutaneo in vitro dell'acido glicirretico, dai veicoli nanoparticellari preparati, sono state utilizzate batterie di celle di Franz (LGA, Berkeley, CA) e membrane strato corneo-epidermide (SCE) derivanti da interventi riduttivi di chirurgia estetica.

Il protocollo sperimentale impiegato per la sperimentazione risulta ampiamente riportato in letteratura. Gli esperimenti di permeazione sono stati condotti depositando su ciascuna membrana SCE, previamente reidratata con acqua distillata, 100 mg/cm<sup>2</sup> delle formulazioni A-C. Il monitoraggio della quantità permeata è stato effettuato mediante analisi HPLC.

#### *3.2.3 Valutazione del profilo di permeazione cutanea di acido glicirretico da SLN mediante il modello dell'eritema cutaneo UVB-indotto*

Lo studio è stato eseguito su venti volontari sani impiegando il protocollo sperimentale precedentemente descritto per la valutazione dell'eritema cutaneo, indotto da esposizione con radiazioni UVB. Per ciascun soggetto quindi sono stati individuati e demarcati, sulla parte centrale dell'avambraccio, siti cutanei sui quali sono state applicate le formulazioni A-C. Per ciascuna formulazione sono stati utilizzati tre siti per ciascun avambraccio e su questi sono stati applicati 100 mg/cm<sup>2</sup> del prodotto mediante Hill Top Chambers. Dopo un trattamento di 3 ore, le formulazioni sono state rimosse e ogni sito pre-trattato è stato sottoposto ad esposizione UV-B a differenti intervalli di tempo dalla rimozione delle formulazioni applicate e cioè: dopo 1 ora (t<sub>1</sub>), dopo 3 h (t<sub>3</sub>) e dopo 6 h (t<sub>6</sub>). In tal modo è stato possibile osservare la diversa risposta antinfiammatoria, con le differenti formulazioni nel tempo. La risposta antinfiammatoria, quantificata mediante il valore di P.I.E. (percentuale di inibizione dell'eritema), risulta infatti direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antiinfiammatorio (acido glicirretico) presente nel tessuto cutaneo, che a sua volta risulta dipendente dal profilo di rilascio dell'attivo dalla formulazione in esame.

### 3. Risultati

#### 3.1 Studio *in vitro* dell'assorbimento per cutaneo.

Dai dati ottenuti negli studi di assorbimento percutaneo *in vitro*, è stato possibile determinare i valori dei flussi allo *steady-state* ( $J_{ss}$ ) attraverso le membrane SCE.

Come risulta dai valori dei flussi riportati nella Tab. 1, l'inclusione dell'acido glicirretico nelle SLN (formulazione A) ha determinato una notevole diminuzione del valore del flusso rispetto alla formulazione C, nella quale l'attivo non risulta inglobato all'interno delle nanoparticelle.

Tab.3 Flussi allo steady-state ( $J_{ss}$ ) ottenuti per l'acido glicirretico attraverso membrane SCE dalle formulazioni: A (SLN contenenti acido glicirretico in veicolo viscosizzato), B (SLN vuote con acido glicirretico libero in veicolo viscosizzato) e C (acido glicirretico in veicolo viscosizzato).

Formulazione	Flusso $\pm$ S.D. ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}^{-1}$ )
A	$0.17 \pm 0.05$
B	$0.32 \pm 0.08$
C	$0.47 \pm 0.07$

#### 3.3 Valutazione del profilo di permeazione cutanea di acido glicirretico da SLN mediante il modello dell'eritema cutaneo UVB-indotto

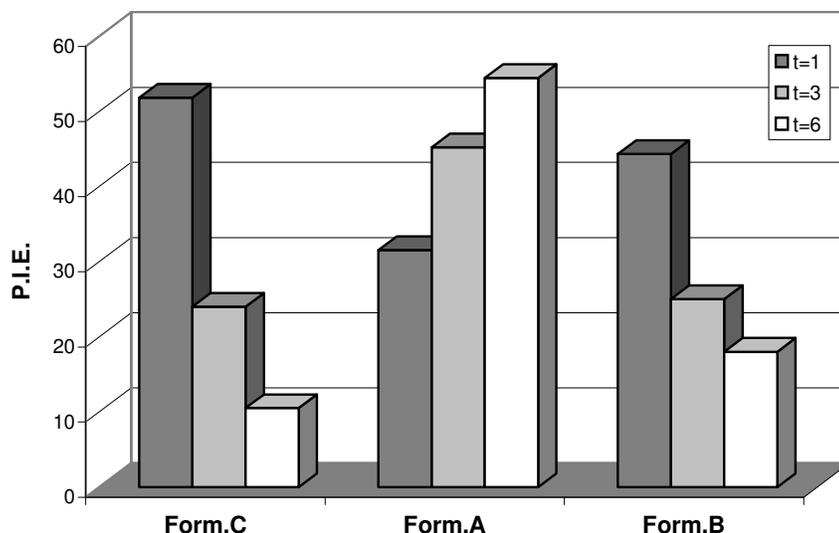
Per monitorare l'entità dell'eritema indotto da UVB, sono state ottenute le curve  $\Delta$  I.E./tempo, dalle quale è stato possibile calcolare i valori delle AUC e da questi le percentuali di inibizione dell'eritema cutaneo (P.I.E.) a tempi differenti ( $t_1$ ,  $t_3$  e  $t_6$ ) e per ciascuna formulazione.

Dai valori di P.I.E. riportati nell'istogramma della Fig. 6, è possibile osservare che:

- l'effetto antinfiammatorio riscontrato dopo la prima ora, dalla rimozione del prodotto, appare elevato per la formulazione C mentre è modesto per la formulazione A nella quale l'acido glicirretico è inglobato all'interno delle SLN e quindi meno disponibile per la permeazione (vedi valori di flusso cutaneo);
- dopo la prima ora, l'effetto antinfiammatorio appare elevato per la formulazione A (acido glicirretico libero) e leggermente inferiore per la formulazione B;
- trascorse sei ore dalla rimozione, l'attività antinfiammatoria risulta elevata soltanto per la formulazione A mentre decresce notevolmente per le formulazione B e C;

Noi riteniamo che l'interessante profilo della risposta antinfiammatoria, ottenuta nel caso della formulazione A, possa essere correlato alla velocità di cessione controllata e ritardata dell'ingrediente attivo dalle SLN. Queste ultime, infatti, potrebbero formare un deposito ("reservoir") nello strato corneo operando così un lento rilascio nel tempo dell'acido glicirretico verso gli strati sottostanti della pelle.

Fig.6 Percentuali di inibizione dell'eritema (P.I.E.) cutaneo indotto da radiazioni UV-B in volontari sani con le differenti formulazioni A-C ed ai diversi tempi.



#### 4. Valutazione della bioadesività di ingredienti e/o di formulazioni cosmetiche destinate al trattamento delle mucose orali o vaginali

Verrà illustrato un recente modello sperimentale che consente di valutare la bioadesività alle mucose (boccali, vaginali) di ingredienti o formulazioni cosmetiche: questo protocollo risulta particolarmente importante nella progettazione ed ottimizzazione di prodotti cosmetici destinate al trattamento delle mucose.

Una delle sostanziali differenze tra la struttura della pelle e quella delle mucose è rappresentata dall'assenza di una barriera selettiva, come lo strato corneo. Mentre l'applicazione di una formulazione cosmetica sulla pelle richiede nella maggior parte dei casi un sufficiente grado di penetrazione cutanea degli attivi in essa contenuti, nel caso delle mucose la diffusione degli attivi attraverso questo tessuto rappresenta un fattore secondario rispetto alla capacità degli stessi di "legarsi" (mucoadesione) alla superficie delle cellule ed aumentare in tal modo il tempo di permanenza o di contatto tra il tessuto e gli attivi con conseguente aumento dell'efficacia del prodotto.

Nel modello, da noi proposto, la mucoadesività è stata determinata utilizzando cellule boccali o vaginali e valutando la percentuale di inibizione del legame lectina-glicoproteina esercitata dall'ingrediente in esame. Le cellule mucosali (boccali o vaginali) vengono trattate inizialmente con lectina biotinilata e successivamente con streptavidina perossidasi e con orto-fenilendiamina.

La lectina è una proteina contenuta in alcune leguminacee (*Canavalia ensiformis*) altamente affine a residui glucosidici e mannosidici presenti nelle glicoproteine di membrana delle cellule mucosali. La biotina è artificialmente legata alla lectina perché capace di legare a sua volta la streptavidina perossidasi, altra proteina aggiunta alla sospensione cellulare e che porta alla formazione del complesso proteina-glucosio-lectina-biotina-streptavidina perossidasi.

La streptavidina-perossidasi catalizza la polimerizzazione ossidativa della o-fenilendiamina, successivamente aggiunta, sviluppando una colorazione giallo-arancio che risulta direttamente proporzionale alla quantità di legami glicoproteina-lectina formati.

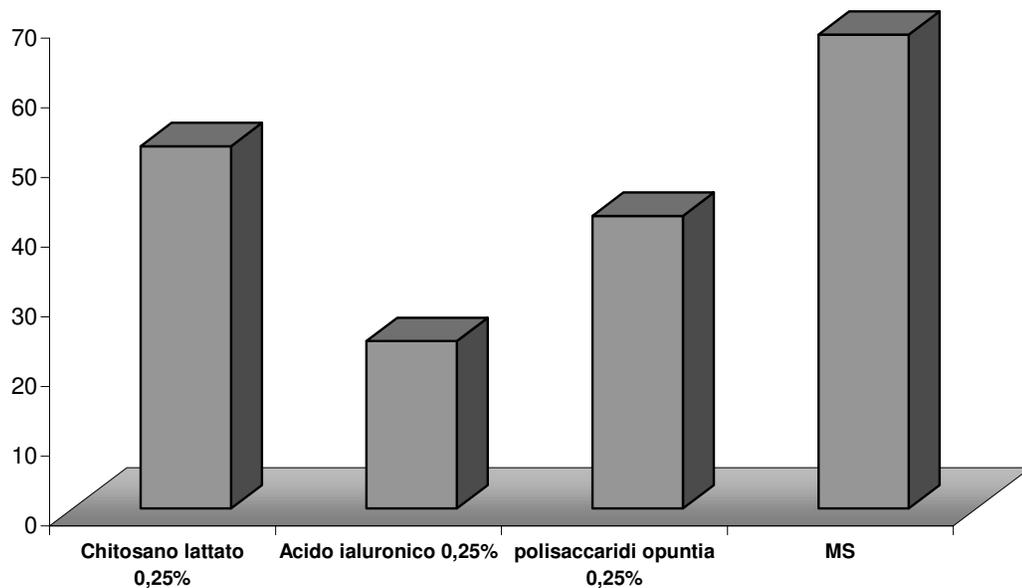
Nella determinazione del grado di mucoadesività di un ingrediente o di un prodotto cosmetico, inizialmente si procede ad incubare questo con le cellule mucosali (incubazione a 30°C per 15 min prima del trattamento con lectina) e quindi si aggiungono i differenti reagenti come descritto sopra. Se l'ingrediente da valutare risulta dotato di proprietà mucoadesive, diminuiranno i siti disponibili per il legame con la lectina, che verrà aggiunta successivamente, ed in tal modo otterremo una diminuzione dell'intensità della colorazione finale.

La capacità mucoadesiva dell'ingrediente può essere espressa come percentuale di inibizione del legame glicoproteina-lectina oppure come percentuale di mucoadesione dell'ingrediente.

Nella Fig.7 sono riportati i valori di mucoadesività di alcuni ingredienti cosmetici determinati con tale tecnica.

Interessante osservare come la combinazione di due polisaccaridi naturali, derivati dal chitosano e dall'Opuntia ficus indica, siano in grado di determinare un interessante sinergismo relativamente alle loro proprietà mucoadesive.

Fig.7 Valutazione della percentuale di mucoadesione del chitosano lattato, dell'acido ialuronico, dei polisaccaridi dell'Opuntia ficus indica e di una miscela di chitosano-opuntia (MS) (coniugato del chitosano lattato con polisaccaridi dell'Opuntia Ficus indica).



## Bibliografia

- 1) A.Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, A. De Pasquale, N. Uccella, T. Barbuzzi, D. Paolino, F. Bonina, In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int. J. Pharm.*, 199 (2000), 39-47.
- 2) F. Bonina, C. Puglia, A. Tomaino, A. Saija, N. Mulinacci, A. Romani, F. Vincieri, In-vitro antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum telephium* L. Leaves. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52 (2000), 1-8.
- 3) F. Bernacchi, C. Puglia, U. Citernesi, F. Bonina, Efficacy evaluation of sun products formulated with radical-scavengers in liposome complexes. *SOFW Journal.*, 12 (2001), 30-37.
- 4) R. Aquino, S. Morelli, A. Tomaino, M. Pellegrino, A. Saija, L. Grumetto, C. Puglia, D. Ventura, F. Bonina, Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *J. Ethnopharm.* 79 (2002) (2) 183-191.
- 5) F. Bonina, C. Puglia, D. Trombetta, M. C. Dragani, M. M. Gentile, G. Calvenna: Vehicle effects on in vitro skin permeation of thiocolchicoside. *Pharmazie.* (2002) (57) 750-752.
- 6) F. Bonina, C. Puglia, D. Ventura, R. Aquino, S. Tortora, A. Sacchi, A. Saija, A. Tomaino, M. L. Pellegrino and P. de Caprariis. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilised extract of *Capparis spinosa* L. buds. *J. Cosmet. Sci.*, 2002, 53, 321-335.
- 7) Puglia C., Trombetta D., Venuti V., Saija A., Bonina F., Evaluation of in-vivo topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004, 56 (10) 1225-1232.
- 8) Trombetta D., Occhiuto F., Perri D., Puglia C., Santagati NA, Pasquale AD, Saija A., Bonina F., Antiallergic and antihistaminic effect of two extracts of *Capparis spinosa* L. flowering buds. *Phytother. Res.*, 2005, 19 (1) 29-33.
- 9) M. Ricci, C. Puglia, F. Bonina, C. Di Giovanni, S. Giovagnoli and C. Rossi Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): in vitro and in vivo studies. *J. Pharm. Sci.*, 2005, 94(5), 1149-1159.
- 10) C. Puglia, S. Tropea, L. Rizza, N. A. Santagati and F. Bonina In vitro percutaneous absorption studies and in vivo evaluation of anti-inflammatory activity of essential fatty acids (EFA) from fish oil extracts. *Int. J. Pharm.* 2005, 299 (1-2), 41-48.
- 11) C. Puglia, E. Esposito, E. Menegatti, C. Nastruzzi, L. Rizza, R. Cortesi and F. Bonina Effect of charge and lipid concentration on in vivo percutaneous absorption of methyl nicotinate from liposomal vesicles *J. Pharm. Pharmacol.*, 2005, 57(9), 1169-1176.
- 12) F. Castelli, C. Puglia, M. G. Sarpietro, L. Rizza and F. Bonina Characterization of indomethacin loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry *Int. J. Pharm.* 2005, 304 (1-2), 231-238.
- 13) E. Esposito, R. Cortesi, M. Drechsler, L. Paccamiccio, P. Mariani, C. Contado, E. Stellin, E. Menegatti, F. Bonina, and C. Puglia Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin. *Pharm. Res.* 2005, 22(12), 2163-2173.
- 14) F. Bonina, C. Puglia, M. Avogadro, E. Baranelli, G. Cravotto The Topical Protective Effect of Soybean-Germ Oil against UVB-Induced Cutaneous Erythema: an in vivo Evaluation. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 2005, 338(12), 598-560.
- 15) D. Trombetta, C. Puglia, D. Perri, A. Licata, S. Pergolizzi, E. R. Lauriano, A. De Pasquale, A. Saija, F. P. Bonina Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. *Phytomed.* 2006, 13, 352-358.



