



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIE FARMACEUTICHE

Tesi di Laurea

Supporto e prevenzione delle manifestazioni cutanee
associate alla patologia diabetica

Relatore:

Candidato:

Prof. Dr. Vincenzo Paolo Maria RIALDI *Diandra Andreea GANEA*

Correlatore:

Prof. Dr. Carla VILLA

Anno Accademico 2020-2021

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	<u>2</u>
<u>LA PATOLOGIA DIABETICA.....</u>	<u>3</u>
<u>SCOPO DELLA TESI.....</u>	<u>4</u>
<u>LE PROBLEMATICHE CUTANEE COLLEGATE AL DIABETE</u>	<u>5</u>
STRUTTURA DELLA CUTE E RUOLO FISIOLÓGICO	5
STRUTTURA DELLA CUTE DI UN PAZIENTE DIABETICO	12
MANIFESTAZIONI CUTANEE DEL PAZIENTE DIABETICO	13
CAUSE DELLE MANIFESTAZIONI CUTANEE DEL DIABETICO.....	15
<u>POSSIBILI INTERVENTI DI PREVENZIONE E SUPPORTO.....</u>	<u>17</u>
<u>OBIETTIVI DELLE FORMULAZIONI COSMETICHE A USO PREVENTIVO.....</u>	<u>21</u>
<u>PARTE SPERIMENTALE</u>	<u>24</u>
<u>SCOPO E PROCEDURA DEL LAVORO SPERIMENTALE</u>	<u>25</u>
<u>MATERIALI E METODI.....</u>	<u>26</u>
INGREDIENTI IMPIEGATI E LORO CARATTERISTICHE	26
MATERIALI ED APPARECCHIATURE UTILIZZATE	31
EMULSIONE O/A SOLIDA	34
PREPARAZIONE A BANCO.....	35
RISULTATI	36
SCALE UP E PREPARAZIONE IN MACCHINA.....	37
RISULTATI	38
EMULSIONE O/A FLUIDA	39
PREPARAZIONE A BANCO.....	39
RISULTATI PRIMA PROVA	40
RISULTATI SECONDA PROVA	42
SCALE UP E PREPARAZIONE IN MACCHINA.....	45
RISULTATI TERZA PROVA	46
<u>CONFEZIONAMENTO ED ETICHETTATURA.....</u>	<u>47</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>51</u>
<u>RINGRAZIAMENTI</u>	<u>54</u>

INTRODUZIONE

La patologia diabetica

Il diabete è una patologia cronica nella quale si ha un'insufficiente produzione di insulina da parte del pancreas oppure un'inadeguata utilizzazione dell'insulina prodotta.

L'insulina è il principale ormone che regola i livelli di glucosio nel sangue. La sua carenza o azione non efficiente porta all'iperglicemia, una condizione che nel lungo periodo causa importanti danni in tutti i sistemi dell'organismo.

Il diabete rappresenta un problema sanitario a livello mondiale ed è in incremento, considerato che dal 1980 al 2014 il numero di soggetti affetti da diabete è quasi quadruplicato, passando da centootto milioni a quattrocentoventi milioni, con prevalenza nelle regioni del mediterraneo orientale ⁽¹⁾.

L'alterato metabolismo glucidico conduce a fenomeni di glicosilazione non enzimatica, nonché alterazioni delle attività enzimatiche che provocano danni a carico del cuore, dei vasi sanguigni, della retina, dei reni, dei nervi e della cute.

In questo studio, l'attenzione è rivolta verso le conseguenze a livello cutaneo che sia il diabete di tipo 1, insulino-dipendente, sia di tipo 2, insulino-indipendente, comportano. Quasi tutti i pazienti diabetici sviluppano complicazioni cutanee a causa degli effetti a lungo termine del diabete, spesso devastanti, sulla microcircolazione e sul collagene dermico. Inoltre, le aree critiche presenti sulla superficie cutanea sono ampiamente suscettibili di infezioni batteriche o fungine.

Il principale fenomeno osservabile è l'invecchiamento della cute, la quale perde nel tempo le sue caratteristiche fisiche come la resistenza, l'elasticità e la resilienza. In realtà la principale componente danneggiata

nella sua struttura risulta essere il derma, mentre il soprastante strato epidermico risente indirettamente di queste alterazioni.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del progetto è quello di realizzare un prodotto cosmetico adatto alle esigenze di una pelle diabetica, che saranno di seguito discusse. Il prodotto dovrà essere specifico ma utilizzabile da chiunque. In questo lavoro sarà percorso l'iter dall'ideazione del prodotto, alla fase di studio e ricerca per gli ingredienti più adatti e la giusta formulazione, ai controlli di stabilità alla produzione e infine al confezionamento ed etichettatura.

Le problematiche cutanee collegate al diabete

Struttura della cute e ruolo fisiologico

La cute è l'organo più esteso del corpo umano e svolge importanti funzioni quali protezione meccanica e da agenti chimici ed infettivi, termoregolazione, impedimento della dispersione di fluidi, sali e vitamine, oltre ad essere uno dei cinque organi di senso in quanto contiene una fitta rete nervosa e corpuscoli tattili. Per adempiere al ruolo fisiologico, le strutture microscopiche della cute devono essere quanto più inalterate e mantenere il loro rigore di organizzazione cellulare.

La cute è divisa in tre strati principali: dall'esterno verso l'interno rispettivamente l'epidermide, il derma e l'ipoderma.

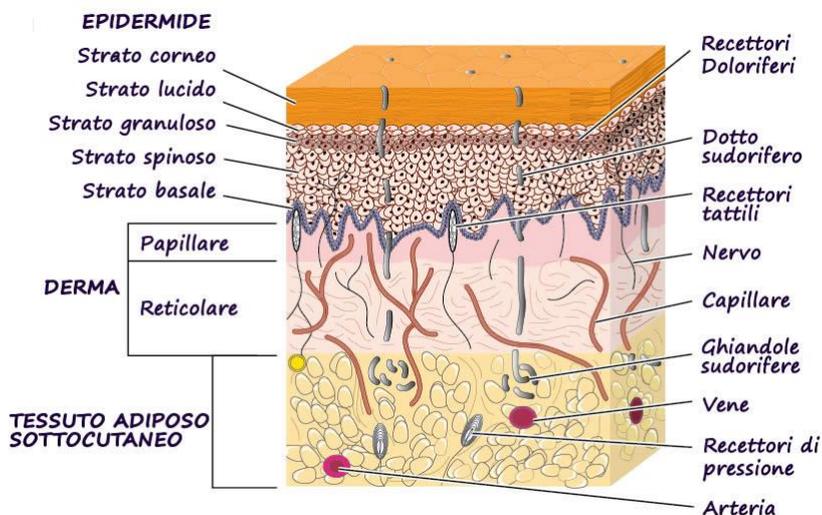


Figura 1 Struttura della cute

(Fonte: Google immagini)

L'epidermide è un epitelio di rivestimento, pluristratificato, corneo e cheratinizzato, costituito a sua volta da cinque strati: basale, spinoso, granuloso, lucido (presente solo in alcune parti del corpo) e corneo. Lo

strato più profondo è quello basale o germinativo costituito da una singola fila di cheratinociti di forma cubica o cilindrica, cellule parzialmente indifferenziate impegnate in un'intensa attività mitotica. Le cellule proliferative dello strato basale sono inoltre affiancate da melanociti che producono melanina e cellule di Merkel coinvolte nella recezione tattile. I cheratinociti dallo strato basale migrano verso l'esterno andando incontro a un processo di cheratinizzazione, ossia di differenziazione, che porta progressivamente alla degenerazione e alla morte cellulare.

Sopra lo strato basale si trova lo strato spinoso, formato da più file di cheratinociti di forma poligonale uniti da ponti intercellulari di filamenti di cheratina chiamati desmosomi. Questo strato contiene anche le cellule cutanee di Langerhans implicate nella risposta immunitaria. Lo strato granuloso è formato da cheratinociti appiattiti e allungati e da granuli di cheratoialina, privi di membrana. La cheratoialina è una miscela di sostanze tra cui la profilaggrina, la quale viene trasformata per defosforilazione in filaggrina, proteina che supporta l'assemblaggio dei filamenti di cheratina e altre funzioni. Nello strato granuloso si trovano anche i corpi lamellari di Odland che producono lipidi intercellulari.

In alcune parti del corpo soggette a maggior attrito, quali i palmi delle mani e le piante dei piedi, è presente uno strato aggiuntivo che conferisce una resistenza supplementare a queste aree, lo strato lucido. Questo strato è formato da cheratinociti appiattiti, privi di nucleo e contenenti eleidina, una lipoproteina ricca di zolfo proveniente dalla cheratoialina, che rifrange la luce e impedisce l'abbronzatura in queste sedi.

Successivamente si dispone lo strato corneo, composto da corneociti appiattiti ripieni di cheratina e strettamente adesi fra di loro, ormai privi di nucleo e organuli. I corneociti che si trovano più in profondità sono

uniti fra loro da corneodesmosomi (giunzioni di membrana), intercalati da materiale lipidico ed immersi in una matrice extracellulare costituita da filamenti di cheratina. Nello strato più esterno, invece, i corneociti hanno perso la loro capacità coesiva e danno origine al fenomeno fisiologico della desquamazione, il quale concorre ad attivare il processo di rinnovamento cellulare.

Lo strato corneo è infine coperto da un film idrolipidico che ha la funzione di proteggere la pelle dall'attacco dei microrganismi e di garantire un'adeguata idratazione superficiale. Questo rivestimento contiene il Natural Moisturizing Factor (NMF), formato dalla proteolisi di filaggrina, che viene idrolizzata in molecole igroscopiche più piccole come l'acido urocanico nella sua forma stabile trans (filtro solare endogeno), citrullina e acido pirrolidon-carbossilico, derivati rispettivamente, dall'istidina, dall'arginina e dall'acido glutammico. L'alta concentrazione di aminoacidi idrofili è cruciale per permettere allo strato corneo di trattenere l'acqua e per mantenere la sua flessibilità.

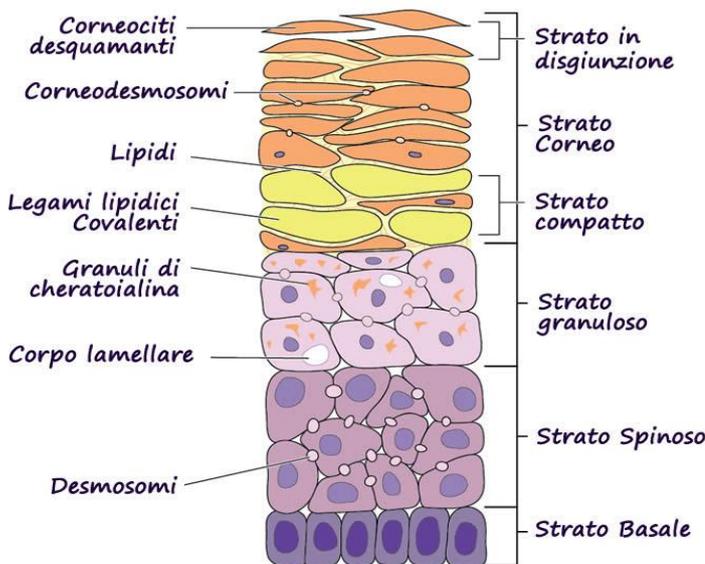


Figura 2 Strati dell'epidermide e diversi tipi cellulari evidenziati
(Fonte: Google immagini)

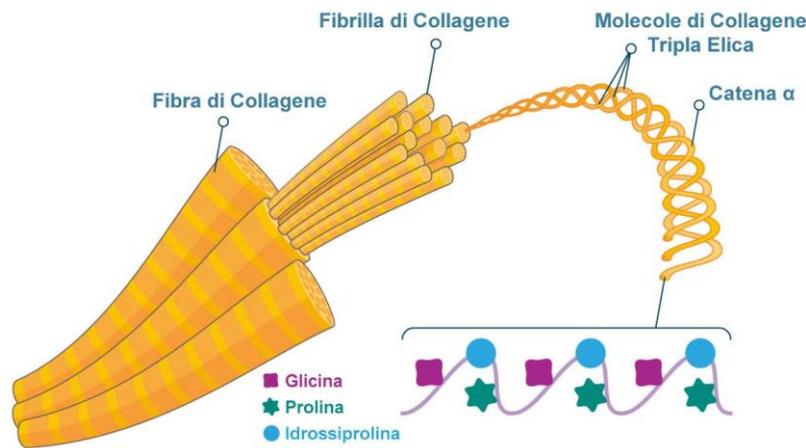
La funzionalità della cute è legata alla propria integrità, soprattutto a quella degli strati più esterni, lo strato corneo e il film idrolipidico che lo ricopre, che subiscono gli effetti delle condizioni degli strati più profondi. L'omeostasi dello strato corneo ⁽²⁾ è garantita da una serie di meccanismi che vedono coinvolte proteine come l'involucrina, la loricrina e la filaggrina. L'involucrina è coinvolta nella formazione del cornified envelope, una struttura insolubile connessa al citoscheletro che ricopre dall'interno la membrana cellulare dei cheratinociti durante il loro processo di differenziazione e che viene stabilizzata in ultima fase dalla loricrina. La formazione di questo involucro conferisce ai corneociti resilienza fisica e li rende insolubili in acqua e in detergenti, e impenetrabili a numerose sostanze estranee, permettendo la protezione dell'epidermide sottostante. Un altro aspetto fondamentale è la modifica strutturale subita dai cheratinociti nel corso del differenziamento, mediata dall'intervento della filaggrina. Il precursore di questa molecola è la profilaggrina, una proteina altamente fosforilata e ad alto peso molecolare contenuta nei granuli di cheratoialina dello strato granuloso, la quale subisce defosforilazione ATPasica e degradazione proteolitica per essere trasformata in filaggrina. Quest'ultima promuove l'aggregazione e l'allineamento dei filamenti cheratinici intermedi, costituenti del citoscheletro cellulare (insieme alla tubulina e all'actina), nelle cellule dello strato granuloso preparandole a diventare corneociti e determinandone quindi l'appiattimento.

La filaggrina, inoltre, è una proteina a rinnovamento rapido e nello strato corneo viene idrolizzata in amminoacidi singoli, principalmente istidina (da cui deriva l'acido urocanico in forma trans), arginina e acido glutammico, che permettono la formazione del NMF e il mantenimento della texture dell'epidermide.

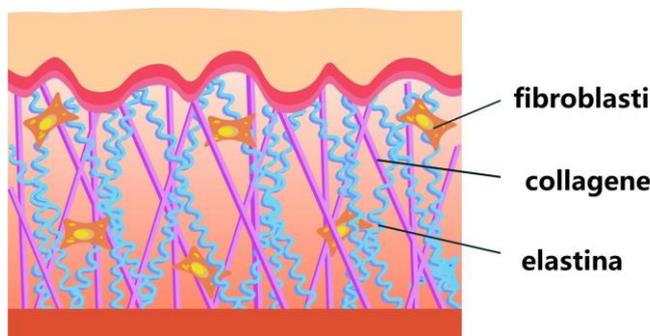
Varie forme di dermatiti e l'invecchiamento cutaneo, condizioni in cui si verifica secchezza dell'epidermide e sua diminuita capacità di trattenere acqua, sono stati associati ad una minore concentrazione di filaggrina e involucrina nello strato granuloso.

Il derma è uno strato elastico e morbido, costituito da tessuto connettivo fibroso la cui funzione principale è quella di conferire supporto e nutrimento alla sovrastante epidermide, priva di vasi sanguigni. Esso, infatti, contiene vasi sanguigni e linfatici, fibre nervose, follicoli piliferi, ghiandole sudoripare e recettori sensoriali tattili. Le cellule più abbondanti nel derma sono i fibroblasti, responsabili della sintesi di fibre collagene elastiche reticolari e delle componenti della sostanza fondamentale amorfa che costituisce la matrice extracellulare (MEC). I fibroblasti infatti, secernono procollagene, precursore del collagene, nello spazio intercellulare. Più molecole di collagene formano le microfibrille che a loro volta si associano in fibre permettendo l'estensione della cute alla trazione. Il collagene è una glicoproteina complessa che viene metabolizzata da proteasi specifiche chiamate collagenasi e nel corso della vita subisce maturazione, degradazione, invecchiamento e sostituzione con nuove molecole. I fibroblasti sintetizzano anche le fibre elastiche costituite da un core di elastina, e anch'esse garantiscono il ritorno della cute alle sue normali dimensioni in seguito ad una trazione. Inoltre, i fibroblasti producono fibronectina, una glicoproteina che conferisce adesione fra le cellule i vari componenti della MEC, ed è quindi importante per la compattezza cutanea.

Le fibre di collagene e quelle elastiche conferiscono quindi elasticità, resilienza e resistenza al derma.



*Figura 3 Organizzazione microscopica delle fibre di collagene
(Fonte: Google immagini)*

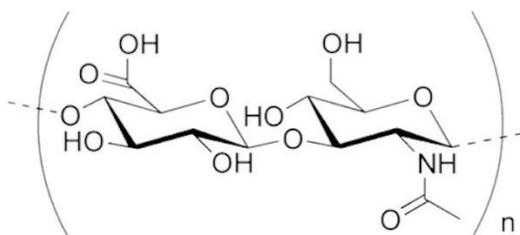


*Figura 4 Disposizione dei principali componenti della matrice extracellulare
(Fonte: Google immagini)*

Oltre ai fibroblasti, nel derma sono presenti anche mastociti, cellule derivate dai granulociti basofili che racchiudono granuli ricchi di eparina (agente anticoagulante), di istamina (mediatore delle reazioni infiammatorie), e di macrofagi (monociti provenienti dal sangue responsabili della risposta immunitaria).

Le cellule e le fibre sono immerse nella matrice extracellulare, costituita prevalentemente da glicosaminoglicani, lunghe catene di disaccaridi nei quali almeno una delle due unità è un aminozucchero (glicosamina o galattosamina). I glicosaminoglicani si legano a un core proteico dando origine ai proteoglicani, i quali formano a loro volta aggregati di grandi

dimensioni con l'acido ialuronico. Si crea in questo modo un gel che trattiene acqua per fornire nutrimento e ossigeno ai tessuti. In particolare, l'acido ialuronico riesce a legare in modo reversibile una quantità di acqua proporzionale al suo grado di polimerizzazione (rapporto acido ialuronico/ialuronidasi) e indirizzarla verso l'epidermide dove in parte viene trattenuta dalle proteine di membrana dei corneociti e dai lipidi interlamellari grazie alla presenza di proteine canale chiamate acquaporine che permettono il passaggio delle molecole di acqua dal derma verso l'epidermide. In parte, l'acqua viene persa tramite la perspiratio insensibilis. Il processo di funzionalizzazione dell'idratazione⁽³⁾ prevede quindi la diffusione dell'acqua dall'interno verso l'esterno, perciò, il contenuto idrico del derma dipende principalmente dall'efficienza della sintesi proteica da parte dei fibroblasti e dallo stato di idratazione dell'intero organismo.



*Figura 5 Formula di struttura dell'acido ialuronico
(Fonte: Wikipedia)*

Il derma ha una forma ondulata per la presenza di papille dermiche, estroflessioni che hanno lo scopo di inserirsi nelle creste presenti nello strato epidermico sovrastante. Questa particolare conformazione anatomica ha lo scopo di aumentare l'aderenza tra i due strati e di favorire gli scambi metabolici, dando origine alla giunzione dermoepidermica.

Lo strato sottocutaneo è formato da adipociti organizzati in lobi e lobuli adiposi separati da setti connettivali nei quali decorrono i vasi sanguigni, e funge da isolante, ammortizzatore degli urti, deposito lipidico e garante dello scorrimento della cute sulle strutture sottostanti.

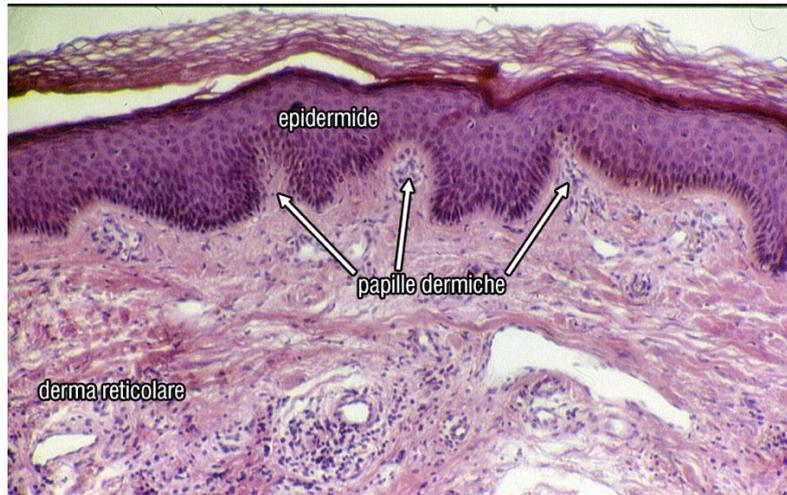


Figura 6 Sezione di cute umana che evidenzia i diversi strati (Fonte: Google immagini)

Struttura della cute di un paziente diabetico

Nella cute diabetica è stata evidenziata una disorganizzazione a carico delle fibre di collagene e della fibronectina, componenti fondamentali della matrice extracellulare del derma. Si ritiene che ciò sia dovuto ad un incremento delle metalloproteasi e della lisil-ossidasi, due enzimi extracellulari che partecipano alla formazione e al rimodellamento delle strutture dermiche di sostegno⁽⁴⁾.

Le metalloproteasi, in particolare le MMP1-collagenasi e le MMP2-gelatinasi A, sono enzimi proteolitici che scindono le fibre di collagene. La lisil-ossidasi è invece responsabile della costruzione di ponti interfibrillari tra le microfibrille di collagene con un meccanismo di cross-linking che assicura la stabilità e l'integrità di queste fibre.

La cute diabetica è principalmente caratterizzata dalla presenza di grandi fasci di collagene disorganizzato nel derma ispessito, dalla distruzione delle fibrille di ancoraggio e dalla spaccatura della lamina lucida. È stata dimostrata anche una diminuita capacità dei fibroblasti di sintetizzare collagene di tipo IV ⁽⁵⁾. Si ha inoltre un ispessimento delle pareti vascolari e la frammentazione delle fibre elastiche longitudinali ⁽⁶⁾.

Tutto ciò comporta una perdita delle proprietà fisiche del derma quali elasticità, resistenza e resilienza, con ripercussione diretta sul soprastante strato epidermico, al quale viene a mancare un adeguato trasporto di acqua legata (idratazione) e un adatto sostegno strutturale e nutritivo. Questo si traduce nella ridotta capacità dell'epidermide di portare a termine in modo funzionale il processo di cheratinizzazione, necessario per il rinnovamento cellulare, con conseguente aspetto invecchiato e rugoso della pelle. La cute diabetica è quindi sottoposta ad un accelerato e prematuro processo di invecchiamento ⁽⁷⁾.

Manifestazioni cutanee del paziente diabetico

È possibile classificare le manifestazioni cutanee che accompagnano la patologia diabetica in varie categorie, in base alle loro caratteristiche ⁽⁸⁾. Gli aspetti più comuni riguardano il derma ispessito associato a edema infiammatorio, degenerazione e ispessimento delle fibre collagene per precoce invecchiamento dei fibroblasti e rallentato turnover del collagene. Queste condizioni si manifestano con gonfiore e tumefazione. La presenza di aree iperpigmentate brune mal delineate a superficie ispessita, su busto, collo, viso, braccia e inguine, dovute a ipercheratosi (aumento dello spessore dello strato corneo), può essere un parametro indicativo dell'esistenza dell'insulino-resistenza ⁽⁹⁾. La diminuita capacità della parete arteriolare ispessita a contrarsi in seguito a stimoli fisiologici

genera un eritema persistente principalmente a livello del viso e del collo. Altre manifestazioni evidenziabili in tutto il corpo riguardano l'ingiallimento della superficie cutanea per accumulo di lipidi (colesterolo e trigliceridi) e deposito di B-carotene, comparsa di vescicole, bolle ed ulcere nelle zone esposte alla luce solare causata da aumento di sostanze endogene fototossiche come le porfirine.

Un altro tipo di lesione molto frequente è l'ulcera diabetica, localizzata soprattutto nelle parti distali degli arti inferiori, ad eziologia multifattoriale che vede coinvolto il sistema nervoso periferico e il sistema vascolare oltre che la possibile contemporanea presenza di infezioni. Questa condizione può portare in maniera subdola a una delle complicanze più temute della patologia, quella del piede diabetico. La perdita di sensibilità del piede, legata a disturbi d'innervazione periferica permette a eventi traumatici anche di piccola entità di provocare nel tempo lesioni, con conseguente comparsa di callosità nei punti di appoggio della pianta. Questa condizione di ispessimento e ipercheratosi della cute, in concomitanza con l'ipossia tissutale generata da disturbi vascolari e l'elevato tasso glicemico, può facilmente evolvere in ulcera, complicata ulteriormente da superinfezioni che ritardano la riparazione della ferita. La lesione può arrivare ad interessare anche tendini, muscoli e ossa causando danni notevoli quali la gangrena, che può portare all'amputazione della regione coinvolta e lo shock settico nel caso in cui l'infezione raggiunge il circolo sistemico⁽¹⁰⁾.



*Figura 7 Localizzazione delle ulcere nel piede diabetico
(Fonte: Google immagini)*

L'eziologia di queste manifestazioni non è del tutto chiara e non esistono al momento terapie mediche universalmente accettate, perciò risulta evidente l'importanza della profilassi, tenendo conto anche delle gravi complicanze alle quali si può andare incontro partendo da lesioni apparentemente insignificanti. Il trattamento di queste patologie non è competenza del prodotto cosmetico ma esso può agire sul comune denominatore di tutte le manifestazioni cutanee correlate al diabete: l'alterazione del processo di idratazione.

Cause delle manifestazioni cutanee del diabetico

Attualmente prevale la teoria secondo la quale l'accumulazione di Advanced Glycation Endproducts (AGE) gioca un ruolo principale nello sviluppo e nella progressione delle varie complicanze diabetiche⁽¹¹⁾. Gli AGE sono il risultato di un'iperglicemia cronica e si formano sia all'interno delle cellule sia nella matrice extracellulare, in seguito a un

processo di glicosilazione non enzimatica. Uno zucchero riducente come il glucosio lega in modo covalente gli aminogruppi liberi delle proteine, formando basi di Schiff che vengono convertite in composti di Amadori labili. Successivamente questi vengono stabilizzati dando origine agli AGE, i quali causano una modifica post-traduzionale irreversibile e non enzimatica nelle proteine coinvolte. I livelli più elevati di AGE sono stati trovati in tessuti con turnover cellulare lento come la pelle, le ossa, i tendini e la cartilagine. A causa dell'elevato tasso di glucosio riscontrabile nel siero dei pazienti diabetici si ha una maggiore formazione di AGE che negli individui sani.

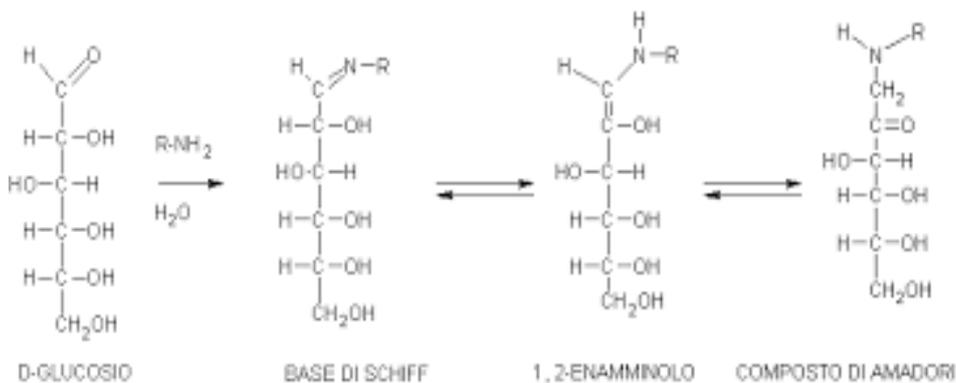


Figura 8 Generica reazione di Maillard che porta alla formazione di composti di Amadori (Fonte: Wikipedia)

È noto anche il fatto che le proteine glicate hanno capacità pro-infiammatorie e sono quindi in grado di scatenare la complessa cascata dell'infiammazione in modo permanente, con conseguenze dannose per il tessuto cutaneo, portandolo ad un invecchiamento precoce⁽¹²⁾. Inoltre, la glicazione delle proteasi necessarie alla degradazione della filaggrina e la sua conversione in fattore idratante naturale ha come conseguenza la radicale diminuzione del livello di idratazione della cute. L'aspetto avvizzito della pelle sembra essere determinato anche dalle distorsioni imposte ai collagene IV e VII della membrana basale⁽¹³⁾. La cute diabetica

è inoltre molto più esposta ad infezioni batteriche, ha un'elevata sensibilità a bruschi sbalzi di temperatura, all'esposizione solare e alle sostanze fototossiche; può sviluppare inoltre discromie pigmentarie ed è permeabile all'accumulazione dei lipidi come il b-carotene.



*Figura 9 Conseguenze della glicazione sulla struttura della pelle
(Fonte: Google immagini)*

Possibili interventi di prevenzione e supporto

La prevenzione delle dermatopatie nel soggetto diabetico passa in primis attraverso un costante controllo dei valori della glicemia e non può prescindere da una particolare attenzione nella cura della pelle.

Dalle osservazioni sperimentali si deduce che la cute di un paziente diabetico debba essere trattata con agenti in grado di ridurre la formazione e l'accumulo di AGE, nonché di incrementare il livello di idratazione e di elasticità. In questo modo si può prevenire in fase precoce l'attivazione di quei meccanismi che portano alle manifestazioni cutanee associate al diabete, agendo all'origine del problema⁽¹⁴⁾.

La strategia adottata è quella di operare su più fronti per massimizzare l'efficacia del trattamento topico. Si possono utilizzare agenti in grado di inibire la formazione di basi di Schiff tra il glucosio e gli aminogruppi liberi delle proteine della cute e la loro conversione in composti di Amadori e in

ultima istanza in AGE. Questi agenti possono essere affiancati da sostanze antiinfiammatorie specializzate per uso cosmetico e altre ad azione sinergica in grado di aumentare sia la sintesi dell’NMF sia dei fasci di collagene connessi con la membrana basale dell’epidermide.

Molti ingredienti sono stati testati per la loro capacità di inibire lo sviluppo di AGE con diversi meccanismi d’azione, come la rimozione delle specie reattive dell’ossigeno, la chelazione dei metalli di transizione, che accelerano la formazione degli AGE, la riduzione della concentrazione di zuccheri liberi o la destabilizzazione delle basi di Schiff (precursori degli AGE).

Derivati vegetali come la curcumina sono stati testati sia in vitro sia in vivo per la loro capacità di inibire la glicazione delle proteine ⁽¹⁵⁾.

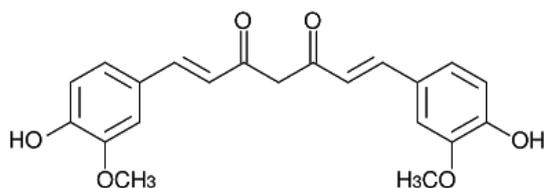


Figura 10 Formula di struttura della curcumina

(Fonte:Wikipedia)

La molecola LR-9, recentemente studiata, è un derivato del metilene bisfenilureido in grado di rimuovere i composti bicarbonilici e di chelare i metalli di transizione coinvolti nella formazione degli AGE ⁽¹⁶⁾.

L’applicazione topica di oligolisina, un oligopeptide con aminogruppi liberi è in grado di reagire con zuccheri non legati e può pertanto ridurre il tasso di glicazione nelle proteine della cute.

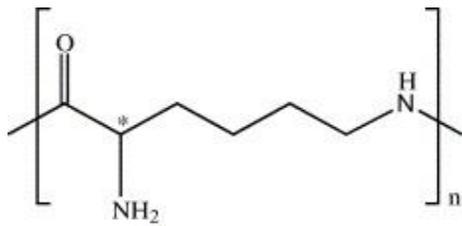


Figura 11 Formula di struttura dell'oligolisina

(Fonte: Wikipedia)

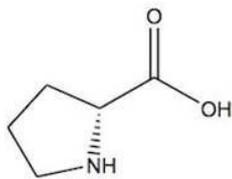
Altri ingredienti hanno dimostrato di possedere un'elevata azione anti-lipoperossidante e bioregolatrice e possono essere utilizzati con successo nella prevenzione della formazione di AGE: un estere dell'acido citrico che contrasta la genesi di radicali liberi e rallenta l'invecchiamento cutaneo e un fitoderivato frazionato, modulatore fisiologico degli ormoni dello stress, liberati dall'epidermide danneggiata⁽¹⁴⁾.

Un altro attivo ad azione protettiva e antiossidante è formato da una miscela di frazioni insaponificabili del polline, dell'olio di soia, di oliva e di germe di grano, che svolge anche un'azione idratante superficiale, essendo un promotore della produzione di filaggrina⁽¹⁴⁾.

Un altro fronte di azione è dato dall'utilizzo di agenti topici antiinfiammatori, capaci di contenere le manifestazioni cutanee derivate da un'esagerata risposta infiammatoria della cute diabetica. Si possono utilizzare infatti alcuni derivati di origine vegetale, modulatori locali della reazione infiammatoria.

Si può anche agire sul livello di idratazione, che si presenta assai scarso nella cute diabetica, incrementandolo grazie all'uso concomitante o singolo di ingredienti come: attivatori della produzione di filaggrina che viene in seguito convertita in NMF, precursori attivi dell'acido ialuronico che garantiscono un'idratazione profonda e duratura e precursori a basso peso molecolare della fibronectina che supportano l'elasticità della pelle.

Risulta indicato anche l'uso di ingredienti in grado di accelerare la sintesi dei collagene, in particolare IV e VII e contemporaneamente la rimozione delle proteine glicate che li degradano, per ridurre il tempo in cui quest'ultime sono presenti ad alta concentrazione nella membrana basale e per restaurare almeno in parte le proprietà elastiche della cute. A questo scopo esistono molecole che includono un precursore a basso peso molecolare del collagene, il quale supporta e ristruttura il collagene già presente in aree in cui questo è ridotto e una miscela bilanciata di poliprolina e acidi grassi essenziali, che stimola la sintesi di collagene in aree in cui questa è ridotta⁽¹⁴⁾.



*Figura 12 Formula di struttura della prolina
(Fonte: Wikipedia)*

Obiettivi delle formulazioni cosmetiche a uso preventivo

Dopo aver analizzato le principali problematiche cutanee e le ripercussioni che queste hanno sulla salute e sulla qualità di vita di un paziente diabetico, l'intento è quello di formulare e proporre dei prodotti cosmetici specializzati e mirati per dare un importante supporto in un contesto in cui la prevenzione è fondamentale ed è ovviamente da preferirsi al trattamento. Il prodotto cosmetico per sua natura non può curare una patologia e non può penetrare negli strati più profondi della cute per contrastarne le alterazioni che avvengono in una situazione di iperglicemia cronica. L'intervento topico è volto a restaurare un benessere sensoriale cutaneo e prevenire la disidratazione profonda, condizione comune di tutte le dermatopatie riscontrate nei diabetici. I prodotti sono concepiti per essere adatti a tutti i tipi di pelle, evitando distinzioni e per essere utilizzati senza richiedere una diagnosi medica dermatologica.

Il cosmetico può mitigare gli effetti della perdita di acqua trattenendola negli strati più esterni della cute. In particolare, è possibile agire con sostanze che sono in grado di aumentare la sintesi di profilaggrina e la sua maturazione, attivando le ATPasi e inducendo l'incorporazione di amminoacidi idrofili nello strato corneo, oppure sostanze igroscopiche ad azione più superficiale che arricchiscono l'NMF e aumentano la quantità di acqua trattenuta nello strato corneo.

I singoli ingredienti attivi che sono stati testati e hanno dimostrato di svolgere una determinata funzione devono essere inseriti all'interno di una formulazione cosmetica adeguata e ben calibrata. È importante stabilire le percentuali di impiego di queste sostanze funzionali per poi procedere con la scelta delle sostanze ausiliarie e la formulazione del prodotto.

Le sostanze ausiliarie qualificate sono inerti e innocui, non devono cioè interagire con gli attivi o provocare danni alle strutture della cute. La loro funzione principale è quella di veicolare e rilasciare le sostanze attive nella giusta concentrazione a livello dei loro siti d'azione specifici, l'epidermide (azione più profonda) o lo strato corneo (azione superficiale). Da quest'azione deriva l'efficacia della formulazione cosmetica. Il parametro principale utilizzato per la scelta delle sostanze ausiliarie è il loro coefficiente di ripartizione olio in acqua (O/A) che deve essere compatibile con quello degli attivi e degli elementi dello strato corneo.

La forma cosmetica più adatta è l'emulsione. In particolare, l'emulsione O/A è formata da una fase discontinua oleosa dispersa sotto forma di goccioline in una fase continua acquosa presente in percentuale maggiore. Questo sistema è preferibile per i propositi sopra citati in quanto consente di veicolare componenti sia idrofili sia lipofili contemporaneamente e permette loro di interagire con le strutture dello strato corneo in modo simultaneo e sinergico. L'emulsione O/A consente inoltre una facile applicazione e l'ottenimento di un effetto idratante veloce, con il vantaggio di una sensazione poco untuosa ed effetto rinfrescante dovuto all'evaporazione di parte dell'acqua presente nella fase esterna.

La formula può essere ulteriormente ottimizzata per soddisfare la conformità ai requisiti del consumatore, assicurandone così l'utilizzo costante e duraturo nel tempo. Infatti, oltre a essere funzionale, la formulazione deve essere dotata di qualità reologiche e sensoriali adeguate: giusta consistenza ed elevata velocità di assorbimento per garantire facilità d'impiego e offrire una buona sensazione sulla pelle, nonché un gradevole odore.

Si è pensato quindi di procedere con la formulazione di due tipologie di prodotti concepiti con gli stessi principi attivi, adatti alle esigenze dei pazienti diabetici: un'emulsione O/A in forma di crema (maggiore percentuale di fase oleosa), più consistente e viscosa con maggior potere di penetrazione a livello cutaneo, da applicare nei punti critici in cui sono presenti segni evidenti di disidratazione.

Come secondo prodotto è stata pensata un'emulsione O/A fluida, più facile da spalmare e destinata ad essere applicata nelle aree più vaste a rischio di disidratazione come gli arti inferiori.

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO E PROCEDURA DEL LAVORO SPERIMENTALE

La prima fase del lavoro comporta l'identificazione e la scelta degli ingredienti adatti, lo studio della formulazione, la preparazione a banco del prototipo e gli studi di stabilità sul prodotto finale.

In seguito, si passa alla preparazione in macchina per produzioni pilota di una quantità più elevata di prodotto.

Per l'immissione in commercio di un cosmetico si deve inviare una notifica attraverso il portale centrale CPNP (Cosmetic Products Notification Portal), una volta raccolta una serie di documenti che evidenzino la conformità del prodotto alla normativa del Regolamento (CE) n. 1223/2009. Prima della notifica si deve eseguire una valutazione della sicurezza da parte di una persona competente e qualificata che analizza tutte le informazioni riguardanti il prodotto richieste dall'Allegato 1 del Regolamento, e stabilisce se il prodotto è sicuro alle condizioni d'uso prefissate.

I due formulati preparati ed analizzati di seguito sarebbero sicuramente autorizzati all'impiego senza restrizioni in quanto conformi al Regolamento europeo. Tutti gli ingredienti utilizzati sono conformi al Regolamento REACH (CE) n. 1907/2006 e sono stati valutati e classificati secondo il Regolamento CLP (CE) n. 1272/2008, ove necessario. Inoltre, durante la preparazione delle formulazioni vengono rispettate le norme GMP (Good Manufacturing Practices), cioè gli standard di qualità specifici di settore.

Tutti questi requisiti comportano l'ottenimento di un prodotto sicuro, efficace e stabile.

MATERIALI E METODI

Ingredienti impiegati e loro caratteristiche

Ingredienti funzionali

ACID PEG-8 ESTER (Xalifin 15).

È un emulsionante lipofilo con HLB di dodici, che consente la preparazione di emulsioni stabili e rappresenta anche un buon veicolo in grado di rilasciare rapidamente gli attivi al sito di assorbimento. È particolarmente adatto per le pelli ruvide e/o irritate

ISODECYL CITRATE (Trioxene-lv).

Ha proprietà emollienti e antiperossidanti. La sua natura polare permette anche una migliore interazione tra fase lipidica e fase idrofila, favorendo quindi l'emulsione.

ACETYLATED GLYCOL STEARATE (Cetacene).

Si comporta come una cera e svolge diverse funzioni all'interno della formulazione: conferisce all'emulsione elevata stabilità, plasticità e una giusta texture, permette una distribuzione rapida e uniforme degli attivi veicolati. Grazie alle sue proprietà questo ingrediente svolge un'azione protettiva ed emolliente per la pelle, lasciandola morbida e vellutata dopo l'applicazione.

PHENOXYETHANOL AND METHYL, ETHYL, PROPYL, BUTYL PARABENS (Undebenzofene-c).

Si tratta di una miscela di parabeni in 2-fenossietanolo, che ha un'azione preservante alla minima concentrazione. Le proporzioni fra i componenti

sono state studiate in modo da ottenere il miglior coefficiente di ripartizione della miscela fra olio e acqua e i migliori risultati del Challenge test che ne misura l'efficacia conservativa.

C10-C18 TRIGLYCERIDES (Nesatol).

È un trigliceride sintetico di origine vegetale ottenuto da acido stearico (C18), palmitico (C16), miristico (C14) e laurico (C12). Data la sua composizione chimica, Nesatol risulta essere un olio sebosimile, con proprietà emollienti e lubrificanti, molto stabile e non comedogeno.

HYDROGENATED TRIGLYCERIDES (Lipocerite).

È una cera sintetica usata nelle formulazioni come fattore di consistenza. Conferisce un effetto vellutante alla pelle senza risultare grassa o appiccicosa.

POLYOXYETHYLENE MYRISTATE AND POLYOXYETHYLENE PALMITATE (Xalidrene).

È un co-emulsionante che porta alla migliore micronizzazione delle particelle della fase oleosa rafforzando così la stabilità dell'emulsione.

PROPYLENE GLYCOL.

È un polialcol usato in bassa percentuale, con caratteristiche igroscopiche che agisce da umettante.

HYDROXYETHYLCELLULOSE.

È un modificatore reologico, utilizzato per aumentare la viscosità della fase esterna e fornire quindi consistenza e stabilità all'emulsione senza renderla appiccicosa, e rende l'emulsione più scorrevole e gradevole al tatto. A differenza di altri prodotti simili non ha azione filmogena.

PPG-25-LAURETH-25 (ADF-oleile).

È un agente fluidificante e detissotropante utilizzato nelle emulsioni O/A per diminuirne la viscosità, che consente di ottenere emulsioni fluide. Nello specifico, ADF-oleile provoca un incremento proporzionale della fluidità al tasso di concentrazione usato, conferisce una scorrevolezza stabile ed uniforme alla formulazione e permette il mantenimento di una consistenza uguale sia a riposo che in seguito ad agitazione.

PEG-10 C12 – C18 ALCOHOLS (Isoxal 11).

È un coemulsionante non ionico con HLB uguale a undici utilizzato nelle emulsioni O/A allo scopo di stabilizzarle evitando la coalescenza dei globuli lipofili.

Ingredienti attivi

POLLEN EXTRACT, GLYCINE SOJA OIL UNSAPONIFIABLES, OLEA EUROPAEA OIL UNSAPONIFIABLES, TRITICUM VULGARE GERM OIL UNSAPONIFIABLES (Filagrinol).

Si tratta di una miscela liposolubile di frazioni insaponificabili di olio di germe di grano, olio di soia e olio di oliva ed estratto di polline entomofilo, in grado di modulare la produzione di filaggrina e apportare un'azione idratante epidermica. È stato dimostrato inoltre che Filagrinol aumenta l'attività dell'enzima ATP-asi coinvolta nella trasformazione della profilaggrina in filaggrina a livello dello strato granuloso.

ISOPROPYLBENZYLSALICYLATE (AND)

ISODECYLSALICYLATE (Salycuminol).

Ha azione modulatrice della risposta infiammatoria locale, cheratoplastica e antilipoperossidasi, in grado di contrastare i fenomeni ossidativi a cui

è sottoposta la pelle diabetica. In particolare, Salycuminol riduce l'attività dell'enzima ornitina decarbossilasi diminuendo la velocità di proliferazione cellulare. Questo comporta una diminuzione nell'attività dell'enzima ciclossigenasi a livello locale e non sistemico. Un'altra caratteristica di questo attivo è quella di ridurre la perossidazione dei lipidi al pari della vitamina E ma a minori concentrazioni. Salycuminol produce anche un aumento di fosfato acido contribuendo ad ottimizzare il processo di cheratinizzazione e del ripristino di una barriera fisiologica efficiente contro stress fisici e chimici.

AQUA, HYDROLYZED GLYCOSAMINOGLYCANS, BETA-GLUCAN, CELLULOSE (Hyaluramine-S).

Si tratta di una soluzione al 20% di glicosamminoglicani idrolizzati con peso molecolare inferiore a 500 Da e con caratteristiche sia idrofile sia lipofile, facilmente assorbita dalla cute. Hyaluramine-S è un precursore dell'acido ialuronico in una composizione stabile che permette un rilascio lento dell'attivo favorendo un'idratazione negli strati più profondi della pelle. Per questo motivo è utile associarlo con l'attivo Filagrinol che ha invece un'attività idratante sull'epidermide, ottenendo in definitiva un effetto sinergico e completo. È stato dimostrato che Hyaluramine-S penetra nella pelle, diventando parte del ciclo anabolico dei mucopolisaccaridi, diventando parte integrante di questi; aumenta quindi il contenuto in mucopolisaccaridi della sostanza fondamentale e promuove la redistribuzione di acqua libera e in acqua legata nel derma. Tutte queste azioni portano al ripristino dello stato di idratazione e dell'elasticità della pelle.

OLIGOPEPTIDE-4 (Collagenon).

È un precursore a basso peso molecolare del collagene, caratterizzato da una sequenza dei suoi amminoacidi tipici, in particolare idrossiprolina, prolina e glicina. Questo è utile per supportare, rinnovare e ristrutturare il collagene cutaneo e rallentare così l'invecchiamento. Negli studi clinici questo attivo ha dimostrato di essere in grado di aumentare l'elasticità e lo stato di idratazione della pelle del 25% e di accelerare il processo di guarigione di una ferita.

OLIGOPEPTIDE-5 (Dermonectin).

È un precursore della fibronectina e in quanto tale contribuisce a ridare elasticità alla pelle. La fibronectina lega diversi componenti della matrice extracellulare come collagene, fibrina, proteoglicani e fibre elastiche contribuendo alla corretta idratazione della pelle. È inoltre fondamentale per il processo di guarigione delle ferite determinando la contrazione della ferita e la formazione di un substrato adeguato alla migrazione e crescita cellulare grazie ai suoi numerosi siti di legame, durante lo sviluppo e l'organizzazione del tessuto di granulazione.

Materiali ed apparecchiature utilizzate

- **Turboemulsore Mambretti.**

Turboemulsore con capacità massima cinque litri utilizzato per prove pilota e produzioni di emulsioni e gel. È composto da una vasca cilindrica in acciaio inox avvolta da un'intercapedine in cui viene fatta circolare acqua calda o fredda rispettivamente per scaldare o raffreddare il prodotto miscelato all'interno. Il sistema prevede anche una valvola ciclica per consentire un raffreddamento graduale richiesto nella lavorazione delle emulsioni. I componenti fondamentali del turboemulsore sono l'omogeneizzatore posizionato sul fondo della vasca e il miscelatore planetario dotato di due elementi raschianti, entrambi azionabili in due velocità.

È inoltre dotato di una pompa ad anello liquido alimentata da acqua di rete per raggiungere condizioni di depressione.



*Figura 13 Turboemulsore mambretti. Manometro e imbuto
(Foto scattata presso il laboratorio Vevy Europe)*



*Figura 14 Turboemulsore Mambretti. Pale del miscelatore planetario
(Foto scattata presso il laboratorio Vevy Europe)*

- **Miscelatore da laboratorio Silverson Modello L5M.**

Omogeneizzatore da banco utilizzato nelle attività di ricerca e sviluppo per la preparazione di piccoli quantitativi di emulsioni o gel (minimo quantitativo lavorabile 200 g).



*Figura 15 Omogeneizzatore Silverson
(Foto scattata presso il laboratorio Vevy Europe)*

- **pHmetro Hanna Instruments Modello HI2210.**

Strumento utilizzato per la misurazione del pH di emulsioni O/A e altri prodotti a base acquosa (gel, tensioattivi e tonici).

Oltre agli strumenti sopra elencati, sono stati utilizzati vetreria e utensili da laboratorio, bilance tecniche e agitatori magnetici con piastra riscaldante.



*Figura 16 Vetreria di laboratorio
(Fonte: Unsplash)*

Emulsione O/A solida

Formulazione prototipo N. 1 (100 g)

<i>FASE</i>	<i>MATERIE PRIME</i>	<i>QUANTITÀ (%)</i>
A	XALIFIN 15 N-P	12,00
A	TRIOXENE-V	3,00
A	FILAGRINOL N-P	7,00
A	SALYCUMINOL	1,00
A	CETACENE	2,00
A	UNDEBENZOFENE-C	1,30
B	ACQUA DEMINERALIZZATA	58,10
B	XALIDRENE	4,00
B	PROPILENGLICHE DCG	2,00
B	HYALURAMINE-S	0,50
B	COLLAGENON	5,00
B	DERMONECTIN	3,00
B	IDRORAMNOSAN	1,00
C	LIPOESSENTIAL-N THYMUS	0,10

Preparazione a banco

Procedura

Si pesano in un becher tutti i componenti della fase A e si scalda su piastra a 70°C sotto agitazione fino a ottenere una miscela completamente omogenea. Si prepara la fase B in un altro becher pesando e miscelando tutti gli ingredienti fatta eccezione per l'idrossietilcellulosa. Il becher si porta a temperatura di 65°C e si aggiunge lentamente l'agente gelificante a pioggia sotto miscelazione, evitando la formazione di agglomerati. Si omogenizza per alcuni minuti la fase B fino a completa dispersione dell'idrossietilcellulosa e in seguito si aggiunge la Fase A a filo dentro la fase B. Si continua a omogenizzare per altri tre minuti, servendosi anche di una spatola per favorire il mescolamento e l'emulsione, assicurandosi così che tutta la massa venga a contatto con il turboemulsore.

Successivamente, l'emulsione viene raffreddata in un bagno di acqua fredda sotto miscelazione lenta e regolare. Inizialmente si formano i primi nuclei e l'emulsione diventa via via più consistente. Raggiunta la temperatura ambiente si aggiunge la fase C con l'utilizzo di una micropipetta e si continua a miscelare per favorire l'incorporazione omogenea del profumo.

Alla fine della preparazione si misura il pH della formulazione che deve essere compreso nel range 5,3-6,3 per assicurare la dermocompatibilità. Il pH misurato è 5,5 e non deve essere corretto.

Risultati

Prove di stabilità dell'emulsione O/A solida

La formulazione ha un aspetto omogeneo, lucido, colore bianco, risulta consistente e filante, ha una profumazione leggera. Queste caratteristiche organolettiche sono state segnate sulla scheda del prodotto per essere in seguito rivalutate nei diversi campioni.

È stata valutata la stabilità a breve termine della formulazione a diverse temperature di stoccaggio e condizioni ambientali per assicurare il mantenimento delle proprietà intrinseche e dell'aspetto organolettico.

Sono stati preparati cinque campioni in contenitori di vetro trasparente che sono stati posti rispettivamente in condizioni di buio (campione di controllo), luce, -5°C , 37°C e 55°C .

Dopo due settimane, sono state valutate le proprietà organolettiche (aspetto, colore, odore) ed è stata rieseguita la misurazione del pH.

Nel campione a 55°C , come prevedibile si è sviluppata sineresi. Si osserva infatti un affioramento della fase oleosa sopra la fase emulsionata e una separazione della fase idrofila che si dispone sul fondo del contenitore. L'alterazione dell'integrità dell'emulsione risulta accettabile ai fini della stabilità nella condizione di stress termico estremo.

Nei restanti quattro campioni le condizioni iniziali sono state mantenute. Il valore di pH non è significativamente variato.

Di seguito vengono riportate le misurazioni.

<i>Condizioni di esposizione</i>	<i>pH dopo 2 settimane</i>
Buio	5,53
Luce	5,58
5°C	5,57
37°C	5,49
57°C	5,28

Scale up e preparazione in macchina

Procedura

Inizialmente si scalda la fase A su piastra sotto agitazione fino alla temperatura di 70°C. Si carica la fase B direttamente nella vasca del turboemulsore, dal rubinetto in alto, azionando la pompa da vuoto fino al valore di -600 mmHg. Si aziona il miscelatore planetario alla velocità più bassa. Si scalda la fase B alla temperatura di 50°C e a questo punto si aggiunge a pioggia l'idrossietilcellulosa omogenizzando alla massima velocità. Si continua ad omogenizzare alla massima velocità sottovuoto e scaldando. Quando la fase B arriva a 65° C si può spegnere il riscaldamento e procedere con l'unione delle due fasi. Mantenendo il vuoto si fa aspirare la fase B dal basso della macchina, affinché sia il più vicino possibile al turbo per garantire un intimo contatto tra le due fasi e per permettere una dispersione più fine. Potrebbe verificarsi una leggera perdita di vuoto dovuta all'aspirazione di aria quindi si riporta il valore della pressione a -600 mmHg. Si continua ad omogenizzare azionando sia il miscelatore planetario sia il turbo alla velocità più alta. In questa fase

avviene l'emulsione che si protrae per circa due minuti. Una volta conclusa questa fase si spegne la pompa da vuoto e il turbo. Segue il raffreddamento graduale grazie alla presenza di una valvola ciclica che invia acqua fredda nella camicia esterna del turboemulsore e si mantiene in azione il miscelatore alla velocità più bassa. Quando l'emulsione raggiunge la temperatura di 30°C si inizia la fase di disareazione a vuoto aspirato continuo sempre continuando la miscelazione. Quando il prodotto è ben disareato si procede con l'aggiunta della fase C: si preleva un certo quantitativo di prodotto in cui si ingloba la fase C e poi si reinserisce in macchina. Nella fase finale, che dura alcuni minuti, si azionano sia il miscelatore sia l'omogeneizzatore alla massima velocità, mantenendo un vuoto di - 400 mmHg per evitare inglobamento di aria, fino al raggiungimento di un prodotto uniforme.

Del prodotto così ottenuto si misura il pH che risulta essere 5,5 e non deve essere pertanto corretto.

Risultati

Anche durante l'operazione di scale up la formulazione ha conservato tutte le caratteristiche sopra descritte e superato le prove di stabilità a breve termine, quindi risulta essere idonea per l'utilizzo.

Emulsione O/A fluida

Preparazione a banco

Procedura

Si pesano tutti i componenti della fase A nel becher e si scalda su piastra sotto agitazione fino alla temperatura di 70°C. Contemporaneamente in un secondo becher si scalda la fase B fino a raggiungere i 65°C. Raggiunte le due temperature si inizia dapprima omogeneizzando la fase B poi si versa a filo la fase A nella fase B continuando a omogeneizzare. Una volta inserita tutta la fase A si continua a omogeneizzare per tre minuti. L'emulsione così ottenuta deve essere raffreddata gradualmente inserendo il becher in un bagno di acqua fredda ed eseguendo la miscelazione manuale con una spatola grande, muovendo tutta la massa di prodotto dalle pareti verso il centro. Quando si raggiunge una temperatura di circa 30°C si inserisce la fase C precedentemente prelevata con una micropipetta. Si miscela ed in seguito si omogenizza nuovamente per due minuti.

Si misura il pH del prodotto ottenuto, che risulta essere 5,59 e non deve essere pertanto corretto.

Formulazione prototipo N. 1 (100 g)

<i>FASE</i>	<i>MATERIE PRIME</i>	<i>QUANTITÀ (%)</i>
A	XALIFIN 15 N-P	10,00
A	NESATOL N-P	4,00
A	SALYCUMINOL	1,00
A	LIPOCERITE	2,00
A	CETACENE	1,00
A	FILAGRINOL N-P	5,00
A	UNDEBENZOFENE-C	1,20
B	ISOXAL 11	4,00
B	ACQUA DEMINERALIZZATA	56,20
B	PROPILENGLICHE DCG	2,00
B	ADF-OLEILE	5,00
B	HYALURAMINE-S	0,50
B	COLLAGENON	5,00
B	DERMONECTIN	3,00
C	LIPOESSENTIAL-N THYMUS	0,10

Risultati prima prova

La formulazione ha un aspetto omogeneo, lucido, colore avorio, ha una consistenza fluida e una profumazione leggera. Vengono preparati cinque campioni del prodotto per valutarne la stabilità a breve termine e si analizzano secondo le procedure sopra descritte per la formula dell'emulsione solida. Anche in questo caso la formulazione passa il test di stabilità in quanto i campioni conservati a temperatura ambiente in condizioni sia di buio sia di luce, non risultano alterati in consistenza,

odore o colore. Quello che si evidenzia è però un aumento della viscosità, non particolarmente gradito per i fini che si prefigge questa tipologia di formulazione.

Formulazione prototipo N. 2

Il secondo prototipo di formulazione si propone di diminuire la viscosità della crema ottenuta precedentemente. Nello specifico a questo scopo, si potrebbe agire sul sistema emulsionante o sui modificatori reologici. Si è scelto il secondo approccio:

- si è diminuita la quantità di LIPOCERITE, mantenendo la percentuale di ADF-OLEILE, agente fluidificante, abbastanza alta (5%);
- si è aumentata la quantità di PROPILENGLICOLE per deviscosizzare l'emulsione, allo stesso tempo riproporzionando la quantità di acqua.

Il procedimento utilizzato per la preparazione a banco della seconda prova pilota è lo stesso di quello descritto in precedenza per la prima prova.

Viene riportata di seguito la formula modificata (100 g).

<i>FASE</i>	<i>MATERIE PRIME</i>	<i>QUANTITÀ (%)</i>
A	XALIFIN 15 N-P	10,00
A	NESATOL N-P	4,00
A	SALYCUMINOL	1,00
A	LIPOCERITE	1,00
A	CETACENE	1,00
A	FILAGRINOL N-P	5,00
A	UNDEBENZOFENE-C	1,20
B	ISOXAL 11	4,00
B	ACQUA DEMINERALIZZATA	55,20
B	PROPILENGLICHE DCG	4,00
B	ADF-OLEILE	5,00
B	HYALURAMINE-S	0,50
B	COLLAGENON	5,00
B	DERMONECTIN	3,00
C	LIPOESSENTIAL-N THYMUS	0,10

Risultati seconda prova

È stata ottenuta un'emulsione dalla texture più fluida rispetto alla precedente. Il pH della formulazione appena preparata è 5,57.

Sono state eseguite nuovamente le prove di stabilità nelle condizioni prestabilite e dopo due settimane sono stati valutati i cinque campioni. Non si sono verificate variazioni significative di pH. Quello che è emerso è che il campione di controllo a temperatura ambiente ha sviluppato una leggera separazione di fase sul fondo e ha subito un incremento della viscosità. La sineresi si osserva più facilmente nel contenitore più grande,

nel quale il prodotto si è mantenuto più fluido sempre a temperatura ambiente. Si conclude che la formulazione non passa il test di stabilità a breve termine.

Di seguito vengono riportate le misurazioni di pH.

<i>Condizioni di esposizione</i>	<i>pH dopo 2 settimane</i>
Buio	5,50
Luce	5,51
5°C	5,51
37°C	5,53
57°C	5,50

Formulazione prototipo N. 3

La formula dell'emulsione fluida è stata ritoccata ulteriormente per aumentarne la stabilità mantenendo il livello di fluidità previsto in fase di ideazione. La formulazione viene eseguita direttamente in macchina lavorando con un quantitativo maggiore (1500 g) per poterne osservare meglio le caratteristiche.

Nello specifico sono state apportate le seguenti modifiche:

- è stata sottratta la LIPOCERITE per avere un miglior controllo sulla viscosità dell'emulsione senza incrementare la percentuale di ADF-OLEILE che è già alta (5%); di conseguenza tutte le quantità degli altri ingredienti della fase A sono state riproporzionate;
- nella fase B si è incrementata la quantità di acqua controbilanciando con la riduzione del PROPILENGLICOLE e dell'attivo COLLAGENON.

Viene di seguito riportata la formula modificata (100 g).

<i>FASE</i>	<i>MATERIE PRIME</i>	<i>QUANTITÀ (%)</i>
A	XALIFIN 15 N-P	12,00
A	NESATOL N-P	7,50
A	SALYCUMINOL	1,00
A	CETACENE	1,00
A	FILAGRINOL N-P	3,00
A	UNDEBENZOFENE-C	1,20
B	ISOXAL 11	4,00
B	ACQUA DEMINERALIZZATA	55,70
B	PROPILENGLICOLE DCG	3,00
B	ADF-OLEILE	5,00
B	HYALURAMINE-S	0,50
B	COLLAGENON	3,00
B	DERMONECTIN	3,00
C	HYDROESSENTIAL THYMUS	0,10

Scale up e preparazione in macchina

Procedura

Si scalda la fase A su piastra sotto agitazione per portarla alla temperatura di 70°C. Contemporaneamente si carica la fase B nella vasca del turboemulsore accendendo il sistema di riscaldamento e azionando il miscelatore planetario alla velocità più bassa e la pompa da vuoto ad un valore di -600 mmHg. Quando la fase B arriva alla temperatura di 65°C, si carica la fase A in macchina aspirandola dal fondo grazie alla differenza

di pressione che si è creata. A questo punto si spegne il riscaldamento e si aziona l'omogeneizzatore alla velocità più alta, aumentando anche la velocità di miscelazione. Dopo due minuti l'emulsione è avvenuta e si spengono la pompa da vuoto e l'omogeneizzatore, si apre la valvola ciclica per consentire un raffreddamento graduale, continuando il mescolamento alla velocità più bassa. Quando il prodotto raggiunge 30°C si inizia la prima fase di disareazione in vuoto aspirato continuo per 30 minuti. Trascorso questo tempo si procede prelevando un'aliquota di prodotto a cui viene aggiunta la fase C. Quest'aliquota viene reinserita nella macchina aspirandola dal basso e continuando la miscelazione. Si omogeneizza ulteriormente per altri due minuti. A questo segue la fase finale di disareazione del prodotto per circa quaranta minuti. Sul prodotto disareato a temperatura ambiente si esegue la misura del pH che risulta essere 5,60 e non deve essere corretto.

Risultati terza prova

Dalle prove di stabilità a breve termine effettuate secondo le procedure sopra descritte risulta che la formula può considerarsi stabile e non necessita di ulteriori modifiche.

CONFEZIONAMENTO ED ETICHETTATURA

La presentazione del prodotto è fondamentale in ambito cosmetico.

Nell'articolo 19 del Regolamento (CE) n. 1223/2009 viene stabilito che i cosmetici possono essere immessi sul mercato soltanto se il contenitore a diretto contatto con il prodotto e l'imballaggio secondario (in genere l'astuccio) riportano, oltre alle eventuali denominazioni di fantasia, alcune indicazioni obbligatorie, che devono essere scritte in caratteri indelebili e in modo facilmente leggibile e visibile.

In particolare, in etichetta i produttori devono riportare:

- il nome e l'indirizzo della persona responsabile dell'immissione sul mercato del prodotto cosmetico;
- il contenuto nominale al momento del confezionamento;
- il numero del lotto di fabbricazione;
- il Paese d'origine per i prodotti fabbricati in Paesi non membri dell'Unione Europea;
- la funzione del prodotto, a meno che risulti dalla presentazione dello stesso;
- le eventuali precauzioni particolari per l'impiego;
- l'elenco degli ingredienti del prodotto nell'ordine decrescente di peso al momento dell'incorporazione.

Etichette e INCI

Emulsione Solida Pelli Diabetiche Rif. Lab. 14955, Vevy Codex 58.5611
Aqua
C12-20 Acid PEG-8 Ester
Olea Europaea Oil Unsaponifiables
Propylene Glycol
Isodecyl Citrate
PEG-20 Palmitate
Acetylated Glycol Stearate
PEG-20 Myristate
Glycine Soja Oil Unsaponifiables
Triticum Vulgare Germ Oil Unsaponifiables
Oligopeptide-4
Hydroxyethylcellulose
Phenoxyethanol
Isopropylbenzyl Salicylate
Isodecyl Salicylate
Pollen Extract
Oligopeptide-5
Methylparaben
Ethylparaben
Hydrolyzed Glycosaminoglycans
Thymus vulgaris Flower/Leaf Oil
Propylparaben
Beta-Glucan
Butylparaben
Cellulose
Linalool

vevy europe
FINISHED PRODUCTS

Emulsione Solida Pelli Diabetiche

Codice 58.5611 Rif. Lab. 14955

Contenuto 30 ml Scadenza 02/2024

Emulsione Fluida Pelli Diabetiche Rif. Lab.15309, Vevy Codex 59.5612
Aqua
C12-20 Acid PEG-8 Ester
C10-18 Triglycerides
PPG-25-Laureth-25
Propylene Glycol
Ceteth-10
Olea Europaea Oil Unsaponifiables
Acetylated Glycol Stearate
Phenoxyethanol
Laureth-10
Myreth-10
Steareth-10
Glycine Soja Oil Unsaponifiables
Oligopeptide-4
Triticum Vulgare Germ Oil Unsaponifiables
Isopropylbenzyl Salicylate
Isodecyl Salicylate
Oligopeptide-5
Pollen Extract
Methylparaben
Ethylparaben
Hydrolyzed Glycosaminoglycans
Thymus Vulgaris Flower/Leaf Extract
Propylparaben
Beta-Glucan
Butylparaben
Cellulose
Linalool

vevy europe 
FINISHED PRODUCTS

Emulsione Fluida Pelli Diabetiche
Codice 59.5612 Rif. Lab. 15309
Contenuto 30 ml Scadenza 10/2023

CONCLUSIONI

Il presente studio mette in evidenza l'efficacia degli attivi e la performance degli eccipienti impiegati, fattori che presuppongono un'alta efficienza delle preparazioni.

Alla fase di progettazione delle formulazioni e verifica della stabilità chimico-fisica seguono i test di contaminazione microbica per controllare l'eventuale presenza di batteri, muffe e lieviti nei prodotti. Avendo seguito le GMP di settore durante la preparazione, questi test dovrebbero restituire l'auspicata conformità microbiologica. Successivamente, le formulazioni devono essere oggetto di valutazione della sicurezza da parte di una persona qualificata e poi di notifica attraverso il portale europeo CPNP. Risulterebbe opportuno svolgere anche un test clinico su pazienti volontari per verificare le ipotesi del lavoro e studiare in dettaglio gli effetti a breve e lungo termine sulla pelle diabetica.

È mio auspicio che il progetto possa suscitare l'interesse da parte di operatori di settore per l'immissione in commercio di prodotti cosmetici dedicati ai pazienti affetti da patologia diabetica, tenendo in considerazione il fatto che, al momento, i prodotti raccomandati non sono così specializzati.

L'introduzione sul mercato di prodotti specifici permetterebbe di mitigare un problema di rilevanza globale, migliorando le condizioni di vita di numerose persone, e allo stesso tempo troverebbe un notevole riscontro economico.

BIBLIOGRAFIA

1. Global Reports on Diabetes, 2016
2. Giacomoni PU (2015) Human Stratum Corneum homeostasis: the relevance of Filaggrin and of inducers of Filaggrin production. Relata Technica Website, Issues
3. Verdier-Sévrain, S., & Bonté, F. (2007). Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of cosmetic dermatology*, 6(2), 75–82.
4. Argyropoulos AJ, Robichaud P, Balimunkwe RM, Fisher GJ, Hammerberg C, Yan Y, Quan T (2016) Alterations of Dermal Connective Tissue Collagen in Diabetes: Molecular Basis of Aged-Appearing Skin, *PloS One* 11, 2016 April 22, e0153806
5. Vazquez F, Palacios S, Aleman N, Guerrero F (1996) Changes of the basement membrane and type IV collagen in human skin during aging. *Maturitas* 25:209-215
6. Hanna W, Friesen D, Bombardier C, Gladman D, Hanna A (1987) Pathologic features of diabetic thick skin. *J Am Acad Dermatol* 16: 546-553
7. Sakai S (2017) Dry Skin in Diabetes Mellitus and in Experimental Models of Diabetes. In: MA Farage, KW Miller, HI Maibach (Editors) *Textbook of Aging Skin*, Springer, 2017 pages 991-1002
8. Chakrabarty A, Norman RA, Phillips, TY (2002). Cutaneous Manifestations of Diabetes. *Wounds*: 14 (8)

9. Duff, M., Demidova, O., Blackburn, S., & Shubrook, J. (2015). Cutaneous manifestations of diabetes mellitus. *Clinical diabetes: a publication of the American Diabetes Association*, 33(1), 40–48.
10. Hayat, A.S., Siddiqui, M.S., & Shaikh, N. (2010). Updates in the Management of Cutaneous Manifestations of Diabetes Mellitus.
11. Ahmed, N (2005) Advanced Glycation Endproducts - role in pathology of Diabetic Complications. *Diabetes Res and Clin Pract*, 67:3-21
12. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D. (1995) Advanced Glycation Endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of V-CAM 1 in cultured human endothelial cells and in mice. *J. Clin. Invest.* 96: 1395-1403
13. Giacomoni PU, Rein G (2017) Skin Aging: A Generalization of the Microinflammatory Hypothesis in: MA Farage, KW Miller, HI Maibach (Editors) *Textbook of Aging Skin*, Springer, 2017 pages 1289-1298
14. Giacomoni PU, Rialdi VPM (2018) Diabetic skin: targeted soothing and support. *Relata Technica Website*, Issues
15. Shajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G (1998) Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. *Biochem Pharmacol* 56:1607-1614

16. Figarola JL, Scott S, Loera S, Tessler C, Chu P, Weiss L, Hardy J, Rahbar S. (2003) LR-90 a new advanced glycation endproduct inhibitor prevents progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. 46:1140-1152. Epub 2003 Jul 5

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutte le persone che sono state parte di questo percorso intenso, non sempre lineare, ma che mi ha permesso di raggiungere un obiettivo importante.

Ringrazio il mio relatore, il Prof. Vincenzo Rialdi, il quale con la sua professionalità mi ha supportata nel lavoro svolto e mi ha trasmesso il suo entusiasmo, rafforzando la mia passione per la cosmetologia.

Ringrazio la Prof. Carla Villa che mi ha dedicato tempo e cordialità.

Ringrazio inoltre, le persone che mi hanno guidata nel lavoro pratico in laboratorio con grande disponibilità e gentilezza.

Una dedica speciale a mia madre che ha sempre creduto in me, che mi ha sostenuta e incoraggiata ad andare avanti, a cui sono infinitamente grata per tutti i sacrifici fatti affinché io potessi arrivare a questo traguardo.

Mando un bacio a mia nonna che avrebbe desiderato condividere con me questo giorno e so che ne sarebbe stata orgogliosa.

Un ringraziamento agli amici che mi sono stati accanto, in particolare: Sabrina, compagna di studi nonché amica incredibile che mi ha presa per mano in un momento difficile e non mi ha più lasciata, dimostrandomi giorno dopo giorno il suo sostegno e affetto sincero;

Michela che per molti anni ha condiviso con me gioie, successi e fallimenti;

Andrea per i suoi preziosi consigli e per avermi insegnato che nulla è impossibile se lo si vuole davvero.