

Scientific Review

Gennaio 2015

**TOLLERABILITÀ ED EFFICACIA DI UN COADIUVANTE
COSMETICO AD ATTIVITÀ LENITIVA A BASE DI
GLICEROFOSFOINOSITOLO ED ESTRATTO DI PERILLA
NELLE DERMATITI PALPEBRALI**

A cura di

Bussoletti C., Tolaini MV., Julienne S., Celleno L.

OXYS™ Publishing

Copyright © 2015

All rights reserved

Tollerabilità ed efficacia di un coadiuvante cosmetico ad attività lenitiva a base di Glicerofosfoinositolo ed estratto di Perilla nelle dermatiti palpebrali

Bussoletti C.*, Tolaini MV.°, Julienne S.^, Celleno L.*

**Centro di ricerca sulle biotecnologie applicate alla cosmetologia (CRBAC), Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma - °Evic Italia, Kalibios, Roma - ^Evic France, BioDepartment, Bordeaux*

Abstract

Le dermatiti che interessano l'area palpebrale, seppure a differente eziologia, rappresentano un disturbo molto comune del volto. Essendo la cute palpebrale particolare per caratteristiche anatomiche, e considerata la contiguità con le strutture oculari, i prodotti topici destinati all'utilizzo in questa regione, siano essi farmacologici che cosmetici, devono possedere un elevato profilo di sicurezza. Scopo di questo studio è stato quello di valutare la sicurezza e tollerabilità di un coadiuvante cosmetico a base di glicerofosfoinositolo ed estratto di Perilla ad attività lenitiva e antinfiammatoria, con specifica indicazione per le dermatiti infiammatorie della regione palpebrale. A tal fine è stato utilizzato un metodo in vitro alternativo al test sugli animali che prevede l'utilizzo di cornee bovine isolate, sulle quali sono state misurate le variazioni di opacità e permeabilità dopo un contatto di 4 ore col prodotto testato. I risultati dello studio sperimentale hanno verificato la buona tollerabilità del cosmetico, che è risultato solo debolmente irritante sulla cornea bovina (Classe 1). In seguito è stato eseguito un test d'uso clinico in singolo cieco su 10 pazienti con dermatite della regione palpebrale (dermatite atopica o di diversa natura) per confermare l'accettabilità cutanea e oculare del prodotto in esame nelle reali condizioni di utilizzo, oltre che la sua efficacia e le sue qualità cosmetiche. A supporto del test in vitro, anche i risultati del test clinico hanno dimostrato che questo prodotto possiede un'ottima tollerabilità cutanea e oculare, oltre che una buona efficacia idratante.

Introduzione

La regione palpebrale è una sede cutanea particolare per caratteristiche anatomiche, essendo dotata di uno strato corneo molto sottile e un tessuto sottocutaneo scarsamente rappresentato. Queste peculiarità la rendono una zona estremamente sensibile e facilmente sede di processi infiammatori, di natura irritativa (più frequentemente) ma anche allergica. Vista la contiguità con la mucosa della congiuntiva e le strutture oculari, la zona palpebrale è inoltre difficile da trattare per il rischio che i prodotti topici applicati finiscano a contatto con la superficie dell'occhio, irritandola o danneggiandola. Per questo motivo, i prodotti formulati specificatamente per questa zona devono possedere innanzitutto la proprietà di non risultare irritanti, qualora dovessero accidentalmente venire a contatto con la cornea o la sclera. I sali di glicerofofosinositolo (GPI), GPI-colina e GPI-lisina, sono derivati semisintetici del glicerofofosinositolo, un componente cellulare naturale prodotto fisiologicamente dal metabolismo dei lipidi e precursore della sintesi dei fosfolipidi di membrana. Il GPI, legandosi all'acido arachidonico (AA), genera il fosfatidilinositolo, uno dei principali fosfolipidi di membrana. Inoltre, questo sequestro dell'AA è in grado di inibire la fosfolipasi A2 citosolica, l'enzima maggiormente coinvolto nel rilascio dell'acido stesso, limitando di conseguenza la cascata di eventi pro-infiammatori correlati al metabolismo di questo acido. Tale meccanismo spiega le caratteristiche antinfiammatorie del glicerofofosinositolo. La colina a sua volta è precursore della sfingomieline, essa stessa precursore delle ceramidi, costituenti fondamentali della porzione extracellulare dello strato corneo. Quindi il composto GPI-colina è dotato anche di attività ricostituente della barriera epidermica, oltre che di attività antinfiammatoria^(1, 2, 3). Utilizzati in concentrazioni dello 0,1-1%, i sali di GPI si sono dimostrati in grado di esercitare attività antinfiammatoria in diverse condizioni cutanee, fisiologiche o para-fisiologiche (pelle sensibile e infiammata, trattamento doposole e antiaging, prevenzione di macchie post-infiammatorie) o francamente patologiche (dermatite seborroica, dermatite atopica, dermatite allergica e irritativa da contatto e psoriasi)^(4,5,6). Scopo del nostro studio è stato quello di valutare il potenziale irritativo di un prodotto cosmetico a base di GPI-colina ed estratto di *Perilla Frutescens* in un distretto particolare come la regione palpebrale.

A tal fine sono stati condotti due studi:

- **STUDIO IN VITRO** su modello sperimentale che utilizza cornee bovine, per valutare il potenziale irritativo oculare;
- **STUDIO IN VIVO** su volontari umani affetti da dermatite palpebrale, per valutare il profilo di sicurezza e tollerabilità sulla cute in normali condizioni di utilizzo, e in via collaterale per valutare efficacia e qualità cosmetiche del prodotto.

Studio in vitro

MATERIALI E METODI

Al fine di stabilire e quantificare il potenziale irritante di un prodotto topico a base di Glicerosfingosinolo in concentrazione dello 0,25 %, *Osmin top palpebrale*, è stato condotto uno studio sperimentale con un metodo in vitro alternativo al test sugli animali.

Il prodotto è infatti stato applicato su cornea bovina isolata.

La tecnica utilizzata è un adattamento di quella descritta da Gautheron e altri autori nel 1992⁽⁷⁾.

Tale studio è stato condotto presso il BioDepartment del centro sperimentale EVIC France, a Bordeaux, nel mese di Agosto 2014, con la coordinazione del laboratorio sperimentale di Evic Italia. Sono state utilizzate come substrato sperimentale tre cornee di vitelli di età inferiore a 8 mesi, conservate appena dopo la macellazione e preparate in condizioni adatte al test; ulteriori tre cornee sono state utilizzate come controlli negativi.

I parametri considerati per questa valutazione sono stati l'opacità e la permeabilità della cornea bovina dopo un contatto di 4 ore con il prodotto in questione. Un aumento della opacità e della permeabilità avrebbe, infatti, significato un danneggiamento più o meno intenso della struttura corneale.

Prima, le cornee sono state montate su appositi supporti, con il lato epiteliale rivolto verso l'alto, e fissate al centro con tre viti; attraverso delle pipette, i compartimenti superiore e inferiore sono stati riempiti con liquido di coltura a temperatura ambiente, eliminando bolle d'aria, in assenza di acqua. Ogni cornea è poi stata immersa a bagnomaria per tre quarti del proprio peso, in posizione orizzontale, alla temperatura di 32 +/- 1 °C per un periodo di pre-incubazione di un'ora; al termine di questo trattamento si è determinata l'opacità a tempo 0 (OPT0).

Quindi, entrambi i compartimenti sono stati svuotati, riempiendo nuovamente quello inferiore con liquido nutritivo e quello superiore, con-

tenente tre cornee, con un campione semiliquido del prodotto testato (750 mg +/- 75 mg). I tre controlli negativi hanno ricevuto 750 µl di liquido nutritivo. L'incubazione, in posizione verticale, è durata 4 ore. Dopo questo tempo di contatto, il compartimento superiore è stato risciacquato con circa 2 ml di liquido nutritivo a 32 +/- 1 °C. Sono stati effettuati almeno 3 risciacqui per eliminare ogni traccia del prodotto testato senza danneggiare la cornea.

Dopo di che, il compartimento superiore è stato riempito con liquido nutritivo per misurare l'opacità corneale (OPT2), uno degli indicatori, insieme alla permeabilità, utilizzati per valutare il danno subito dalla cornea.

L'opacità corneale è stata rilevata con un opacimetro che determina una differenza nella trasmissione del flusso di luce tra due pareti e genera un valore numerico di opacità. Prima e dopo ogni lettura, lo strumento è stato calibrato con tre specifici calibratori.

La misurazione dell'opacità corneale è stata effettuata a tempo 0, prima dell'applicazione del prodotto testato (OPT0) e immediatamente dopo la fine del periodo di contatto (OPT2).

Questa misura è stata comparata con quella di un 'vacuum' ottenuto in un compartimento dello strumento senza cornea, riempito solo di liquido nutritivo di coltura.

La permeabilità corneale, invece, è stata rilevata dopo la seconda misurazione della opacità (OPT2) nel modo seguente: entrambi i compartimenti del modello sperimentale, superiore e inferiore, sono stati svuotati, riempiendo nuovamente quello inferiore con liquido nutritivo, mentre 1 ml di soluzione di fluoresceina (a 5mg/ml) veniva aggiunto nel compartimento superiore. L'incubazione è durata un'ora e mezza in posizione verticale, con nutritivo a 32 +/- 1 °C.

Al termine del trattamento, è stata estratta la fluoresceina rimasta nel compartimento superiore, mentre il massimo volume di liquido nutri-

tivo del comparto inferiore veniva aspirato con una siringa ad ago lungo e trasferito in un tubo identificato corrispondente a ogni supporto.

Si è poi misurata la densità ottica (OD) dei diversi liquidi con uno spettrofotometro a 490 nm (software VISIONlite™ version 2.2). Il valore del liquido nutritivo corrispondeva allo zero della lettura. Per ogni cornea veniva ottenuto un valore, in modo da avere tre valori per le cornee trattate con il prodotto testato e tre valori per le tre cornee che fungevano da controllo negativo.

Per le unità testate a ogni tempo di contatto, sono state calcolate le medie di ciascun parametro (differenza OPT2- OPT0 e OD).

L'aggiustamento dei valori è stato effettuato sottraendo i valori medi ottenuti nelle tre cornee che hanno agito da controllo negativo.

È stato poi calcolato uno score corneale con i valori medi aggiustati, in accordo con la seguente formula:

$$\text{Corneal Score} = (\text{OPT2} - \text{OPT0}) + (15 \times \text{OD})$$

Il valore era espresso con un decimale.

Il punteggio ottenuto ha permesso di classificare le unità testate in accordo alla seguente classificazione:

Score 4h	Class	Classification
Score 4h \leq 40	Class 1	Slightly irritant
40 < Score 4h \leq 100	Class 2	Moderately irritant
Score 4h > 100	Class 3	Irritant to severely irritant

RISULTATI

Il valore medio del Corneal Score 4h, calcolato sulla base delle variazioni della opacità e della permeabilità corneale, è stato di:

2.3 (+/- 2.1 deviazione standard)

Considerata la classificazione proposta sulla base del valore numerico ottenuto, il prodotto rientra perciò nella categoria 'debolmente irritante', ovvero la minore delle tre classi di potenziale irritativo.

I risultati ottenuti in ogni misurazione sono visibili nell'appendice 1.

Studio in vivo

MATERIALI E METODI

Al fine di confermare in vivo i dati emersi dal modello sperimentale dello studio in vitro, è stato eseguito un test d'uso clinico monocentrico (centro sperimentale Evic Italia, Roma) in cieco singolo, sotto controllo dermatologico e oftalmologico, nei mesi Settembre – Ottobre 2014.

Sono stati arruolati 10 volontari rispondenti ai seguenti criteri di inclusione specifici:

- età compresa tra i 35 e i 60 anni
- sesso femminile
- fototipo (Fitzpatrick): I, II, III o IV
- dermatite atopica o dermatiti di diversa natura della cute perioculare

La popolazione esaminata è stata giudicata un campione rappresentativo dei potenziali consumatori a cui il cosmetico è rivolto. Il prodotto in esame è stato fornito ai volontari, che lo hanno applicato due volte al giorno (mattina e sera) per 28 giorni consecutivi (+/- 2 gg) sul contorno occhi, secondo le normali condizioni di utilizzo indicate per il prodotto.

La verifica dell'accettabilità cutanea e oculare è stata effettuata attraverso l'esame clinico delle aree cutanee in esame, prima e dopo 28 giorni consecutivi d'uso del prodotto (+/- 2 giorni), da parte del medico dermatologo e del medico oculista e attraverso la valutazione delle sensazioni di fastidio riferite direttamente dai volontari agli sperimentatori nel corso dello studio.

La valutazione dell'efficacia cosmetica è stata ef-

fettuata con la corneometria, eseguita con CorneometerCM 825 (Courage + Khazaka), prima e dopo 28 giorni consecutivi d'uso del prodotto (+/- 2 giorni), sulla cute dell'area perioculare per la determinazione del livello di idratazione.

La valutazione dell'efficacia e delle qualità cosmetiche è stata effettuata da parte dei volontari che, al termine dell'utilizzo del prodotto, hanno espresso il proprio giudizio relativamente alle seguenti affermazioni:

efficacia cosmetica

- il prodotto ha una buona efficacia idratante
- il prodotto ha una buona efficacia lenitiva
- il prodotto rende la pelle più levigata
- il prodotto allevia le irritazioni cutanee
- il prodotto allevia le sensazioni di fastidio
- il prodotto rende la pelle più elastica

qualità cosmetiche

- il prodotto ha una profumazione gradevole
- il prodotto ha una consistenza gradevole
- il prodotto si stende rapidamente
- il prodotto si assorbe facilmente
- il prodotto non unge la pelle

RISULTATI

Per quanto riguarda l'accettabilità cutanea e oculare, gli sperimentatori nel corso dello studio non hanno riscontrato la comparsa di alcuna reazione cutanea od oculare imputabile al prodotto in esame, e nessuna sensazione di fastidio è stata riferita dai volontari partecipanti alla sperimentazione.

Inoltre, dopo 28 giorni di utilizzo del prodotto, è stato riscontrato un aumento statisticamente significativo del livello di idratazione cutanea. I valori medi della corneometria al giorno 1 e al giorno 28 e la loro variazione sono visibili nella seguente tabella:

D1/t0	D28	Variazione D28 vs D1/t0
46,48	50,61	+8,89% p<0,01 <i>Statisticamente significativo</i>

I risultati della valutazione soggettiva dell'efficacia del prodotto da parte dei partecipanti allo studio sono riportati nella tabella sottostante:

Affermazione	%di soggetti soddisfatti
il prodotto ha una buona efficacia idratante	100%
il prodotto ha una buona efficacia lenitiva	90%
il prodotto rende la pelle più levigata	100%
il prodotto allevia le irritazioni cutanee	80%
il prodotto allevia le sensazioni di fastidio	90%
il prodotto rende la pelle più elastica	70%

Il prodotto è stato inoltre molto apprezzato per le sue qualità cosmetiche, perché ha una consistenza gradevole, si stende rapidamente, si assorbe facilmente e non unge la pelle.

DISCUSSIONE

Le dermatiti irritative palpebrali si manifestano con eritema, secchezza, fine desquamazione, e si accompagnano spesso a bruciore e prurito; una sintomatologia simile, ma solitamente più intensa e recidivante, caratterizza le dermatiti allergiche da contatto. Le sostanze che sono maggiormente implicate nella genesi di queste dermatiti sono costituenti di detergenti e prodotti cosmetici formulati per il viso (creme, latti, lozioni) e prodotti per il make-up (mascara, eye-liner, ombretti, ma anche smalti e solventi per unghie, veicolati dal contatto con le dita). Considerata la sensibilità e la fragilità della regione palpebrale, un prodotto con caratteristiche antinfiammatorie e ristrutturanti, potrebbe essere ideale nel trattamento delle dermatiti palpebrali. Essendo infatti

questo tipo di dermatiti così frequenti e spesso croniche e recidivanti, l'utilizzo di farmaci a base di steroidi dovrebbe essere limitato ai casi più severi e ristretto a brevi periodi di tempo. Caratteristica fondamentale che deve possedere un coadiuvante cosmetico lenitivo destinato alla regione palpebrale è però l'assenza di potere irritante, per poter essere utilizzabile con tranquillità vicino al distretto oculare. Secondo le condizioni sperimentali adottate nello studio in vitro, il prodotto cosmetico *Osmín top palpebrale* ha dimostrato solo un lieve potenziale irritativo sulla cornea. Questa caratteristica lo rende un prodotto ragionevolmente sicuro, nelle normali condizioni di utilizzo, come è stato poi confermato dal test d'uso clinico sotto controllo dermatologico e oftalmologico (studio in vivo). Considerata poi la sua composizione e le proprietà antinfiammatorie già dimostrate del GPI, suo principale componente, tale prodotto risulta particolarmente indicato nel trattamento a lungo termine di dermatiti palpebrali di varia origine (DIC, DAC, dermatite atopica etc.).

CONCLUSIONI

Nella valutazione di un prodotto cosmetico ad attività antinfiammatoria e lenitiva destinato alla cute della regione palpebrale, è necessario considerare quanto questo sia sicuro e tollerato in una zona così delicata.

La contiguità con la superficie oculare, infatti, implica la possibilità accidentale che una seppur minima quantità di prodotto possa venire a contatto con la congiuntiva oculare, la sclera o, ancor più pericolosamente, la cornea.

Ovviamente, per motivi etici, è impossibile testare questo evento accidentale in vivo su soggetti umani o animali; il metodo alternativo impiegato nello studio descritto ci permette di ovviare a questo problema. Infatti questa metodica sperimentale, che prevede l'utilizzo di cornee bovine isolate, montate su appositi supporti, ricrea con buona approssimazione il modello umano e per-

mette di fare una valutazione, anche quantitativa, dell'entità di un'eventuale danno corneale in una condizione di rischio estremizzata (un contatto della cornea con il prodotto testato prolungato per 4 ore). Alla luce dei risultati descritti, il prodotto testato, *Osmín top palpebrale*, è risultato solo debolmente irritante sulla cornea e ottimamente tollerato nelle normali condizioni di utilizzo; per questo si può affermare che tale prodotto è sicuro e ben tollerato in un distretto delicato quale è la cute palpebrale.

Appendice 1

T ON THE ISOLATED CALF CORNEA (BCOP) CALCULATION SCORE

TIME OF CONTACT : 4 hours		Scales of the opacitometer : 0							
Receipt date : August 4, 2014		OPACITY before treatment (OPT0)							
Treatment date : August 5, 2014			CONTROL	MEASURE					
Cornea use : After conservation		CALIBRATOR 1:	-76	75					
		CALIBRATOR 2:	-153	150					
		CALIBRATOR 3:	-225	229					
Name : Sarah JULIENNE B14 0826		OPACITY after treatment (OPT2)							
		CALIBRATOR 1:	-76	75			PERMEABILITY		
		CALIBRATOR 2:	-151	150			wavelength:490nm		
Bain Marie control t.°C : 32°C		CALIBRATOR 3:	-223	227			OD control : 0.884 (sol to 5 µg/ml)		
Support Nos	TREATMENT	OPT0	OPT2	OPT2 - OPT0	adjusted opacity	OD	OD adjusted	SCORE OPa+150Da	
11	CONTROL	-1	0	1		0.005	0.005	0.1	
26	MEM	0	0	0		0.005	0.005	0.1	
4		-1	-1	0		0.006	0.006	0.1	
Observations :			MEAN :			0.3	0.005	0.005	0.1
			S.D : ±			0.6	0.001	0.001	0.0
21	OSMIN TOP PALPEBRALE	0	1	1	0.7	0.007	0.002	0.7	
16	Ref: XE 653-RF 604	0	2	2	1.7	0.005	0.000	1.7	
12	14-1557 As supplied	1	6	5	4.7	0.004	-0.001	4.6	
Observations :			MEAN :			2.3	0.000		2.3
			S.D : ±			2.1	0.002		2.1

Risultati ottenuti in ogni misurazione

Bibliografia

1. Corda D, Iurisci C, Berrie CP. Biological activities and metabolism of the lysophosphoinositides and glycerophosphoinositols. *BiochimBiophys Acta*. 2002 May 23;1582(1-3):52-69
2. Amandi-Burgermeistera E, Tibesb U, Kaiserc BM, Friebed WG, Werner V, Scheuera WV. Suppression of cytokine synthesis, integrin expression and chronic inflammation by inhibitors of cytosolic phospholipase A2, *European Journal of Pharmacology*, Volume 326, Issues 2–3, 20 May 1997, Pages 237–250
3. Corda D, Zizza P, Varone A, Bruzik KS, Mariggì S. The glycerophosphoinositols and their cellular functions. *BiochemSoc Trans*. 2012 Feb;40(1):101-7
4. M. Innocenti, PD. Pigatto, S. Veraldi. Il glicerofosfoinositolo sale di colina topico nelle dermatiti infiammatorie e allergiche, *Derma Cosmo news* n°5, 2007
5. A. Motolese, M. Simonelli. Effect of glycerophosphoinositolsalt of choline 1% cream on mild-to-moderate inflammatory and allergicdermatitis, *DermatologicalExperiences* 2008, 10, 135-40
6. Pazzaglia M, Tosti A. Efficacyevaluation of a treatment with a Glycerophosphoinositolcholine lenitive lotion by scalpdermatoscopy, Department of Specialistic and ExperimentalClinical Medicine – Unit of Dermatological Clinic, Alma Mater StudiorumUniversity of Bologna, January 2007
7. Gautheron P et al. *Fundam Appl Toxicol* 1992, 18, 442-449

