

Nuovo filtro fisico

*Biologicamente compatibile
e rassodante della pelle*

Parole chiave

Idrossiapatite
Filtri solari
Anti-età
Foto-invecchiamento
Compatibilità cutanea

Luigi Rigano¹, Nicola Lionetti¹, Chiara Andolfatto¹, Giancarlo Gazzaniga²,
Francesco Rastrelli³, Adriana Bonfigli⁴

¹Rigano Industrial Consulting & Research, Milano - ²Consulente, Pavia
³Kalichem Italia, Botticino Sera, Brescia - ⁴ISPE, Milano

email: rigano@thecosmetologist.com

RIASSUNTO

Un nuovo attivo minerale micro-disperso, compatibile con la pelle e appartenente al gruppo delle idrossiapatiti, si è dimostrato in grado di incrementare significativamente la protezione dagli UV. Le sue caratteristiche sono comparabili, e perfino superiori, a quelle del titanio biossido in nano-particelle.

Aumenta, infatti, del 10% l'assorbimento UV dello standard COLIPA P3 e può sostituire perfettamente il titanio biossido in emulsioni acqua-in-olio a SPF 30 e 50+.

È stata inoltre condotta una serie di valutazioni su donne di 40-70 anni, per verificarne l'efficacia *anti-age*. Miglioramenti significativi sono stati ottenuti in termini di elasticità biologica e riduzione delle rughe, in confronto al placebo. È stato registrato un significativo effetto *soft focus* cutaneo.

INTRODUZIONE

Alcuni attivi protettivi cutanei non sono poi così compatibili con la cute, come sarebbe desiderabile. Quasi tutte le sostanze *non-self* (estranee all'organismo) applicate sulla pelle, tendono a diffondere in profondità e/o ad interferire con il metabolismo cutaneo, talora con problemi di tollerabilità, specialmente quando l'attività progettata era destinata a livello della superficie cutanea.

Un esempio per tutti: al fine di prevenire il danno cutaneo indotto dai raggi UV, si usa un largo numero di filtri, sia UVA che UVB, che assicurano foto-protezione ad ampio spettro, bloccando la penetrazione dei raggi attraverso l'epidermide, assorbendoli e/o riflettendoli. Gli effetti degli UV sulla pelle includono sia risposte

acute, come scottature, pigmentazione, iperplasia, immunosoppressione e sintesi di vitamina D, sia effetti cronici, specialmente foto-cancerogenesi e foto-invecchiamento (1-4).

Le strategie di foto-protezione sono volte a limitare tutti gli effetti negativi indotti dalla sovrapposizione. Seppure efficienti, però, i filtri organici possono produrre sostanze pericolose, se irradiati quando sono in contatto con cellule viventi (5-7). Studi epidemiologici indicano per gli assidui utilizzatori di prodotti solari un aumento dei rischi di melanoma maligno (8-10), ma nessuna associazione medica ha pubblicato finora raccomandazioni per evitarne l'uso. Meta-analisi hanno concluso che non esistono evidenze di correlazioni positive tra uso di solari e melanoma maligno (11,12).

Ciò nonostante, la tendenza attuale è quella di fabbricare solari *skin friendly*, dermo-compatibili, contenenti soltanto filtri inorganici. Infatti, il principale ingrediente inorganico dei prodotti solari, il titanio biossido (TiO₂) usato da anni nei prodotti cosmetici, è comunemente considerato inerte e sicuro. Tuttavia è un semiconduttore, con un intervallo di banda nella regione dei 3.0 eV, corrispondente a lunghezze d'onda inferiori ai 380 nm circa. TiO₂ è quindi suscettibile all'eccitazione da raggi UV e una volta foto-eccitato può generare abbondanti ROS in soluzione acquosa (13-15).

Alcuni studi suggeriscono che l'uso frequente di solari contenenti TiO₂ ultra-fine (30-220 nm) possa portare ad assorbimento percutaneo di titanio (16,17), sua penetrazione nello strato corneo umano e nei bulbi piliferi (18), così come nei fibroblasti in colture (19). Le cellule HeLa, cellule tumorali 'immortali' spesso usate nei laboratori scientifici, muoiono in seguito ad ir-

radiazione con raggi UV per 10 minuti, se in presenza di TiO_2 (17). TiO_2 irradiato causa danno ossidativo degli acidi nucleici nelle cellule (19) e rottura dei filamenti in DNA isolato (13,15,20).

L'accurato rivestimento, quasi stabile, con strati protettivi di materiali minerali o organici è il metodo oggi utilizzato per evitare la maggior parte delle reazioni indesiderate, tuttavia molte ricerche sono oggi rivolte alla ricerca di alternative al titanio biossido.

Le idrossiapatiti

Le idrossiapatiti sono forme minerali di calcio apatite, corrispondenti alla formula generale $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ che si ritrovano in alcune rocce. Nel complesso gruppo delle apatiti di varia composizione, l'idrossiapatite propriamente detta contiene lo ione idrossile (OH^-) (Fig 1), che può essere sostituito in dosi variabili da ioni fluoruro, cloruro o carbonato. Le sostituzioni modificano la resistenza agli acidi e le proprietà meccaniche dei cristalli (e dei denti). Cristallizza nel sistema cristallino esagonale, ha peso specifico 3.08 e occupa la quinta posizione nella scala di durezza di Mohs.

In polvere, l'idrossiapatite pura è bianca, tuttavia le apatiti presenti in natura possono anche essere marrone, gialle o verdi per impurezze varie.

Idrossiapatite si trova anche nelle ossa e nei denti. Il 70% delle ossa umane è costituito da idrossiapatite minerale (21). Di conseguenza, molti studi riportano l'uso di idrossiapatite come *filler* nella

sostituzione di ossa amputate o come rivestimento per favorire la crescita ossea negli impianti protesici (22-24). Idrossiapatite è impiegata con frequenza come *filler* semi-permanente in alternative non chirurgiche di trattamento delle rughe e dei tessuti della pelle, nell'estetica del ringiovanimento cutaneo. Un tipo di idrossiapatite carente in calcio carbonato è il principale minerale di cui sono composti la dentina e lo smalto dei denti, cui conferisce capacità di proteggere dall'erosione acida (25-27). Nel cavo orale, possiede attività restitutive per lo smalto, antiplacca e antimacchia. Come lento rilasciatore di ioni calcio e fosfato alle cellule cutanee, è stato proposto come ingrediente anti-età.

Dopo attenta considerazione dei lavori pubblicati in letteratura e delle applicazioni sopra riportate, abbiamo iniziato la verifica dell'attività *anti-aging* di una idrossiapatite di grado speciale. Poiché questa ha una lenta solubilizzazione al pH fisiologico della pelle, abbiamo investigato anche le sue proprietà come possibile sistema di rilascio biocompatibile. Nel corso di queste ricerche, con sorpresa, abbiamo rilevato l'attività come filtro solare, che è stata poi quantificata.

MATERIALI E METODI

Il materiale impiegato è una sospensione bianca di particelle di idrossiapatite micronizzate (< 100 nm) attivate con tracce di elementi:

(Zn, Mn, Mg) $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$ (Lattato) a pH circa 7. La sostanza attiva (*Apalight*®, Kalichem Italia, Botticino Sera, BS) in sospensione è circa il 30%. La sospensione è conservata con fenossietanolo, metilparabene ed etilparabene; l'agente sospendente è costituito da una miscela di gomma xanthan e di un copolimero sintetico acrilico (ammonium acryloyldimethyl taurate/VP copolymer).

Test in-vivo

Efficacia anti-rughe

Scopo dello studio era di valutare l'influenza di questa variante di idrossiapatite sull'efficacia di una crema funzionale anti-rughe. Si sono misurati parametri di idratazione, sebo, elasticità e rugosità cutanea, e comparati con i valori del placebo senza apatite. Dieci volontarie (età 40-70 anni), selezionate per lo studio, hanno applicato, a casa, i prodotti due volte al giorno per 4 settimane, ciascuno su un solo lato del viso.

All'inizio dello studio sono state eseguite misure strumentali, condotte in camera climatizzata (24°C; 50% rh) di idratazione cutanea (Corneometer CM 825), sebo (Sebumeter SM 810), elasticità (Cutometer SEM 575) tutti di Courage & Khazaka (Stoccarda, Germania) e rugosità cutanea (Skin Surface Replicas and Image Analysis, Monaderm, Monaco). La scelta del lato di applicazione sul viso (destra o sinistra) delle due creme con idrossiapatite o placebo è stata casuale. Alla fine del trattamento, si sono ripetute le misure strumentali sui soggetti. Nel calcolo finale, si sono presi in considerazione i seguenti parametri chiave:

- U_f = massima deformazione della pelle (parametro R_0)
- U_a / U_f = elasticità generale (parametro R_2)
- U_v / U_e = rapporto viscoelastico (parametro R_6).

Il sebo cutaneo è espresso in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Le impronte negative della superficie cutanea (repliche) sono state effettuate con un polimero sintetico a rapido indurimento (SILFLO - Flexico Ltd, UK) e dischi adesivi. Sono stati analizzati poi con un software che processa le immagini (Quantilines, Monaderm, Monaco) in accordo con il metodo di Corcuff. La replica è stata illuminata da una fonte luminosa con angolo incidente di 35°. Un'immagine che copre 12 x 9 mm² di cia-

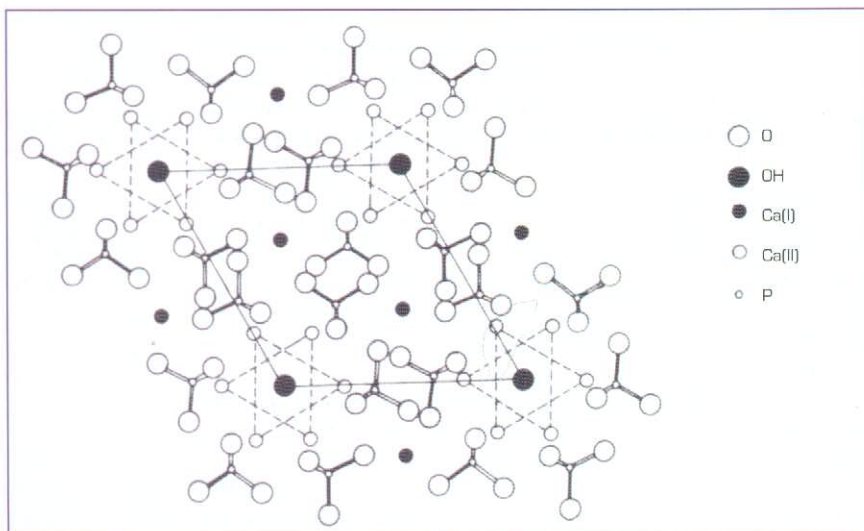


Figura 1 Proiezione sul piano basale degli ioni costituenti l'idrossiapatite

scuna replica cutanea è stata acquisita da una video-camera (High Performance CCD camera, COHU, Monaco). Questo software permette di misurare i seguenti parametri: **Ra**: rugosità media, **Rz**: rugosità massima. L'efficacia anti-rughe si dimostra con la diminuzione dei valori di **Ra** e/o **Rz**, alla fine del trattamento. Inoltre, sono state riprese fotografie digitali (Fotofinder Dermoscope Ver. 2.0, Teachscreen, D) per valutare l'effetto *soft focus*.

Rinnovamento cutaneo

Sono state selezionate per lo studio dieci volontarie (età media: 18-55 anni). Prima dell'inizio del trattamento, una sospensione di dansyl cloruro (in olio minerale al 5%) è stata applicata in tre diverse aree degli avambracci dei volontari, per 24 ore mediante patch in occlusione. Dopo la rimozione del patch, è stata verificata con una lampada al quarzo la presenza di macchie fluorescenti, cui è stato assegnato un punteggio di intensità. Le volontarie hanno poi usato i prodotti (con idrossiapatite o placebo) due volte al giorno, fino alla scomparsa delle macchie, mentre una terza area non trattata fungeva da controllo. L'intensità delle macchie è stata valutata dopo 5 giorni di applicazione del prodotto. Sono stati inoltre considerati i giorni necessari per la totale scomparsa della fluorescenza.

È stata anche valutata la quantità di cellule desquamanti prima e dopo il trattamento; i corneociti sono stati raccolti con un nastro adesivo (D-squame) sulla superficie cutanea e il numero è poi stato misurato con un colorimetro (Chroma Meter, Minolta, Osaka, Japan).

Rilascio controllato ed efficacia deodorante

Scopo dello studio era verificare la capacità dello speciale grado di apatite nell'aumentare il potere deodorante della clorexidina, quando questa fosse incapsulata (al 4%) in una sospensione di apatite. L'ipotesi era legata alla sostituzione degli ioni calcio nell'idrossiapatite con il catione della clorexidina. Sono stati selezionati 12 soggetti (età media: 40 anni) che hanno usato un detergente non profumato per 7 giorni, allo scopo di condizionare le ascelle prima del test. Dopo questo periodo, tre valutatori addestrati hanno eseguito uno *sniff test* e hanno assegnato un punteggio di odore con una scala da 0 a 10. I volontari hanno quindi applicato i due prodotti (la sospensione ed il placebo) sulle ascelle, per un periodo di due settimane. Dopo l'ultimo trattamento è stato ripetuto lo *sniff test*.

Rilascio controllato ed efficacia filtrante

(metodo SPF internazionale, UVAPF Colipa 2007)

Sempre nell'ipotesi di rilascio controllato e solubilizzazione programmata, si è verificato se un'emulsione standard (Colipa Standard P3) mostrasse diversa efficacia filtrante qualora uno dei filtri, l'ensulizolo, fosse introdotto in formula, come tale, con il 6% di idrossiapatite (HA) o incapsulato in HA. Ancora una volta l'ipotesi funzionale era di sostituzione dello ione fosfato con il benzimidazol solfonato.

Le due formule sono state valutate usando il metodo Colipa (International SPF test Method Colipa, CTFA-SA, JCI A and CTFA, 2006), in confronto allo standard Colipa formula P3 non modificato.

In seguito, considerati i risultati ottenuti, abbiamo provato 3 nuove formule (Colipa Standard P3 e due emulsioni W/O: un solare SPF 30 ed uno SPF 50+). Ciascuna formulazione è stata realizzata con la stessa percentuale di HA o, rispettivamente, titanio biossido (rispettivamente 6% nello standard Colipa P3, 4% nell'SPF 30 e 5% nell'SPF 50+).

La scelta di questa prova è supportata anche dall'osservazione che HA non lascia sulla pelle il residuo blu-bianco caratteristico del biossido e, a parità di quantità, ha minore incidenza sul costo-formula. L'evidenza è stata ottenuta con prove applicative. Inoltre, sulla base delle caratteristiche chimico-fisiche e strutturali (struttura ionica del reticolo) non reagisce con i filtri UVA della famiglia del dibenzoil metano.

La prima coppia di formule (P3) è stata testata in accordo con il metodo SPF internazionale; le rimanenti due coppie in accordo con il metodo SPF internazionale e con l'UVAPF Colipa 2007.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati hanno mostrato differenze non significative tra il prodotto testato e il placebo, nelle prove di rinnovamento cutaneo, idratazione e sebometria.

Rimarchevoli risultati sono invece stati ottenuti nel caso della rugosità cutanea, dove **Rz** (Fig 2) subisce una variazione di -9.5% ($p < 0.05$). Anche i risultati di elasticità sono significativi, specialmente per l'elasticità biologica' R_2 : +10.3%, $p < 0.05$ e per il 'coefficiente di viscoelasticità' R_6 : -17.1%.

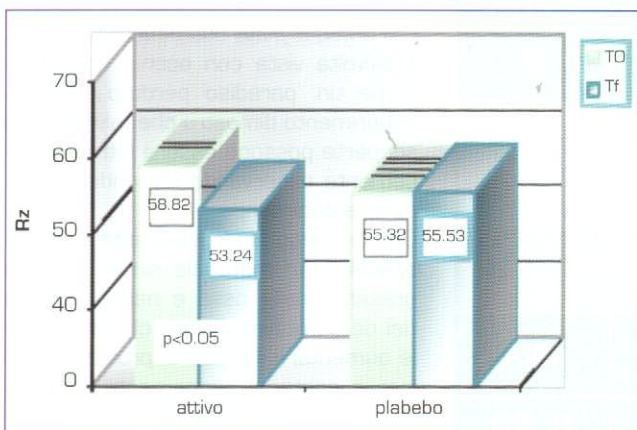


Figura 2 Rugosità cutanea in volontari trattati con una sospensione contenente idrossiapatite o placebo dopo 4 settimane di trattamento

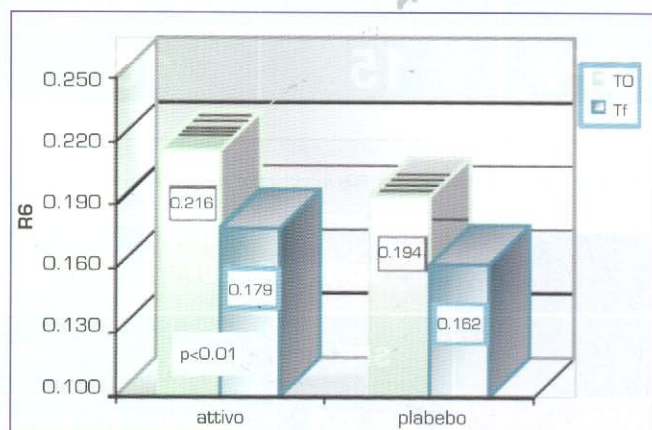


Figura 3 Viscoelasticità cutanea in volontari trattati con una sospensione contenente idrossiapatite o placebo dopo 4 settimane di trattamento

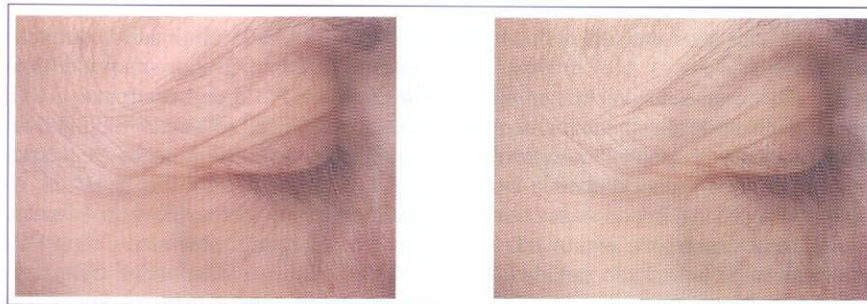


Figura 4 Effetto soft focus di un'emulsione contenente apatite prima (a sinistra) e dopo (a destra) dopo 4 settimane di trattamento

$p < 0.01$ (Fig 3), mentre il placebo non ha indotto effetti statisticamente significativi. Risultati interessanti sono visibili nelle foto digitali (Fig 4), dove l'effetto soft focus di HA è evidente.

In particolare, per 6 volontarie su 10 si è riscontrata riduzione delle rughe sottili, mentre 3 volontarie su 10 hanno avuto riduzione del volume delle rughe profonde.

Tabella 1 Filtri solari combinati con HA o titanio biossido

Filtri Solari	%		
	P3 SPF 15	SPF 30	SPF 50+
Ethylhexyl Methoxycinnamate	3	10	10
Butyl Methoxydibenzoylmethane	0.5	2	2
Ensulizole	2.78		
Ethylhexyl Salicylate		4	4
Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate		7	10
Ethylhexyl Triazone		1.5	3

Tabella 2 SPF ottenuta per aggiunta di TiO_2 o di idrossiapatite allo standard Colipa P3

	P3	P3 + 6% TiO_2	P3 + 6% HA
SPF	15	16	17.5

Tabella 3 Effetti della sostituzione di TiO_2 micronizzato con apatite micronizzata in due formulazioni solari

	Solare SPF 50+		Solare SPF 30	
	SPF	UVA	SPF	UVA
TiO_2	65.00	0.38	34.10	0.50
HA	66.20	0.33	40.30	0.35

Prove di rilascio controllato

Per quanto visto finora con il solare e la clorexidina, i risultati relativi alla potenziale capacità di controllo del rilascio da parte dell'apatite sono stati piuttosto deludenti. Sia l'efficacia deodorante che il potere filtrante non mostrano differenze significative in paragone ai rispettivi placebo. Nell'elaborazione dei risultati, tuttavia, abbiamo osservato che la formula Colipa standard P3 con 6% di HA presentava un notevole aumento del valore di SPF rispetto alla stessa formula senza HA. In particolare, il valore di SPF dello standard Colipa era 15 ed il valore della stessa formula con il 6% di HA era 17.5%.

Efficacia filtrante

Considerati i risultati sopra riportati, abbiamo testato 3 formulazioni, Colipa standard P3 e due emulsioni W/O: un solare con SPF 30 ed uno con SPF 50+ (Tab 1). Ognuna delle 3 formulazioni è stata realizzata con la stessa percentuale di HA e titanio biossido (rispettivamente 6% nello standard Colipa P3, 4% nell'SPF 30 e 5% nell'SPF 50+). Altri filtri presenti in ciascuna formulazione sono riportati in Tabella 1. I risultati ottenuti sono riportati nelle Tabelle 2,3.

In tutti i casi, le valutazioni hanno evidenziato un aumento dei valori di SPF. In particolare, nel caso dello standard Colipa, l'aumento è del 9% circa, per il solare SPF 30 del 18% circa e per il solare SPF 50 del 2% circa. Nel caso dell'UVAPF, le differenze sono trascurabili. Il rapporto UVA/UVB richiesto dal COLIPA è comunque soddisfatto.

CONCLUSIONI

Dal punto di vista cosmetico, la Natura è talvolta vista con occhio nostalgico come un 'paradiso perduto'. Questo esperimento dimostra che talvolta vere scoperte possono essere fatte semplicemente osservando il mondo biologico che ci circonda.

Con l'impiego di idrossiapatite di grado speciale, un materiale simile a quello presente nelle ossa e nella struttura dei denti, abbiamo visto che è possibile aumentare il grado di protezione solare e contemporaneamente migliorare anche alcuni parametri della pelle invecchiata.

Sono attualmente in corso prove aggiuntive per sviluppare ulteriori interes-

santi applicazioni. Nella nostra ricerca, ci lasciamo ancora guidare dalla fisiologia umana, ma siamo sempre attenti alle sorprese che non mancano mai di dare soddisfazione al nostro lavoro di ricercatori.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Gasparro FP, Mitchnick M, Nash JF (1998)**
A review of sunscreen safety and efficacy
Photochem Photobiol **68** 243-256
- 2 Bissonauth V, Drouin R, Mitchell DL, Rhainds M, Claveau J, Rouabhia M (2000)**
The efficacy of a broad-spectrum sunscreen to protect engineered human skin from tissue and DNA damage induced by solar ultraviolet exposure
Clin Cancer Res **6** 4128-4135
- 3 Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA et al (2001)**
Solar UV irradiation and dermal photoaging
J Photochem Photobiol B **63** 41-51
- 4 Gi EM, Kim TH (2000)**
UV-induced immune suppression and sunscreen
Photodermatol Photoimmunol Photomed **16** 101-110
- 5 Xu C, Green A, Parisi A, Parsons PG (2001)**
Photosensitization of the Sunscreen Octyl p-Dimethylaminobenzoate b UVA in Human Melanocytes but not in Keratinocytes
Photochem Photobiol **73**(6) 600-604
- 6 Knowland J, McKenzie EA, McHugh PJ, Cridland NA (1993)**
Sunlight-induced mutagenicity of a common sunscreen ingredient
FEBS Lett **324**(3) 309-313
- 7 Damiani E, Greci L, Parsons R, Knowland (1999)**
Nitroxide radicals protect DNA from damage when illuminated *in vitro* in the presence of dibenzoylmethane and a common sunscreen ingredient
Free Radic Biol Med **26** 809-816
- 8 Garland C, Garland F, Gorham E (1992)**
Could sunscreens increase melanoma risk?
Am J Public Health **82**(4) 614-615
- 9 Westerdahl J, Ingvar C, Masback A, Olsson H (2000)**
Sunscreen use and malignant melanoma
Int J Cancer **87** 145-150
- 10 Autier P, Dore JF, Schifflers E et al (1995)**
Melanoma and use of sunscreens: An EORTC case control study in Germany, Belgium and France
Int J Cancer **61** 749-755
- 11 Huncharek M, Kupelnick B (2002)**
Use of topical sunscreens and the risk of malignant melanoma: a meta-analysis of 9067 patients from 11 case-control studies
Am J Public Health **92**(7) 1173-1177
- 12 Dennis LK, Beane Freeman LE et al (2003)**
Sunscreen use and the risk for melanoma: a quantitative review
Ann Intern Med **139**(12) 966-978
- 13 Ashikaga T, Wada M, Kobayashi H, Mori M, Katsumura Y et al (2000)**
Effect of the photocatalytic activity of TiO₂ on plasmid DNA
Mutation Res **466** 1-7
- 14 Fairhurst D (1997)**
Surface coating and the optimization of microfine oxides in sunscreen formulations. A new technology for sunscreen development
Cosmet Toil **112** 81-84, 86-88
- 15 Kobayashi M, Kalriess W (1997)**
Photocatalytic activity of titanium dioxide and zinc oxide. The effect of organic and inorganic surface treatments
Cosmet Toil **112** 83-86
- 16 Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ (1996)**
A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens
Australas J Dermatol **37** 185-187
- 17 Cai R, Hashimoto K, Itoh K, Kubota Y, Fujishiina A (1991)**
Photokilling of malignant cells with ultrafine titanium dioxide powder
Bull Chem Soc Jpn **64** 1268-1273
- 18 Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H et al (1999)**
Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **12** 247-256
- 19 Warner WG, Yin JJ, Wei RR (1997)**
Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide
Free Radic Biol Med **23** 851-858
- 20 Shen B, Scaiano JC, English M (2006)**
Zeolite encapsulation decrease TiO₂-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblasts
Photochem Photobiol **82** 5-12
- 21 http://spazioinwind.libero.it/teobenedetti/ceramici_calcio_fosfati.htm**
consultato luglio 2009
- 22 <http://www.azom.com/details.asp?ArticleID=107>**
consultato luglio 2009
- 23 <http://www.c14dating.com/bone.html#apatite>**
consultato luglio 2009
- 24 <http://webmineral.com/data/Hydroxylapatite.shtml>**
consultato luglio 2009
- 25 Kawamata H, Fujita K, Ishizaki T, Hayman R, Ikemi T (2004)**
A new enamel restoring agent for use after bleaching
J Dental Res **83** 1919
Honolulu Abstracts, Special Issue A
- 26 Arakawa T, Ishizaki T, Hayman RE, Hanada N, Senpuku H (2003)**
Interaction of small crystal form of Hydroxylapatite with mutans streptococci
J Dental Res **82** B81-0548
Goteborg Abstracts
- 27 David Hay K, Urray Thomson W (2002)**
A clinical trial of the anti-caries efficacy of casein derivatives complexed with calcium phosphate in patients with salivary gland dysfunction
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **93**(3) 271-275

