

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

*Funzionalizzazione di micro e nano particelle di Chitosano
con Acido Ascorbico: nuovi delivery-system di attivi
funzionali per Cosmetici e Dispositivi Medici*

RELATORE: Chiar.mo Prof.re Nicola Realdon

CO-RELATORI: Dott.Fabio Brunetta, Dott. Mattia Battistin

LAUREANDO: Alberto Ceccato

Matricola: 1166920

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1. Pelle	3
1.1.1. Epidermide	3
1.1.2. Derma.....	5
1.1.3. Ipoderma.....	6
1.2. Nanoparticles biopolimeriche	7
1.2.1. Metodi e Polimeri utilizzati nella formazione delle nanoparticles	7
1.2.2. Chitosano	12
2.2.2.2. Chitina	12
2.2.2.2. Proprietà del chitosano.....	13
2.2.2.2. Utilizzi in ambiente biomedico e farmaceutico.....	15
1.3. Acido Ascorbico e Sodio Ascorbato	20
1.4. Vitamina PP	22
1.4.1. Il complesso vitamina B3	23
1.4.2. Utilizzi farmacologici della Vitamina PP in dermatologia e cosmetica	23
1.5. Cosmetici e Dispositivi medici	25
1.5.1. Cosmetici	25
1.5.2. Dispositivi medici.....	26
2. PARTE SPERIMENTALE	29
2.1. Strumenti e Materiali	29
2.2. Metodi	29
2.2.1. Sintesi delle nanoparticles	29
2.2.2. Caratterizzazione delle nanoparticles.....	30
2.2.2.1. Spettroscopia FT-IR	30
2.2.2.2. Titolazione via cromatografia HPLC	30
2.2.2.3. Test di cessione	31
2.2.2.4. Velocità di sedimentazione	31
2.2.2.5. Potenziale Z (DSC/ELS)	32
2.2.2.6. Particle size.....	36
2.2.2.7. Analisi al microscopio	37
2.2.2.8. Preparazione delle emulsioni	37
2.2.2.9. Analisi Chimico-Fisiche sul prodotto finito	39
2.2.2.10. Attività antiossidante in vitro. Metodo DPPH	40
2.2.2.11. Tecniche di invecchiamento accelerato.....	42
2.3. Risultati e Discussione	44
2.3.1. Caratterizzazione delle nanoparticles.....	44
2.3.1.1. Spettroscopia FT-IR	44
2.3.1.2. Titolazione via cromatografia HPLC	46
2.3.1.3. Test di cessione	48
2.3.1.4. Velocità di sedimentazione	49
2.3.1.5. Potenziale Z (DSC/ELS).....	53
2.3.1.6. Particle Size	53

2.3.1.7.	Analisi al microscopio ottico	55
2.3.1.8.	Attività antiossidante in vitro	58
2.3.1.9.	Analisi Chimico-Fisiche sulle emulsioni.....	60
3.	CONCLUSIONI	65
4.	BIBLIOGRAFIA	67

ABSTRACT

Il lavoro di tesi mira alla ricerca di un addotto funzionale attivo in grado di ridurre i danni ossidativi a carico della cute attraverso un' azione antiossidante.

La pelle è un apparato delicato dove ogni singolo stadio è il risultato d'una precisa evoluzione che prepara a un'involuzione in risposta ad esigenze inderogabili. Il mantenimento delle funzioni legate a questo apparato è fondamentale, di cui la principale è l'essere una barriera in senso bidirezionale, primo baluardo dell'organismo nei confronti dell'ambiente esterno.

Cosmetici e dispositivi medici possono senz'altro apportare un sostegno significativo, ove ci siano i presupposti per una possibilità d'azione.

Il lavoro di ricerca di tipo sperimentale mira in primis ad un metodo efficiente di sintesi di nanoparticelle di chitosano con acido ascorbico, molecola attiva con effetto di scavenger cioè di eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno, e vitamina PP, molecola antiage e protettiva della barriera cutanea.

Elaborato il metodo di sintesi, vari sono stati i test eseguiti al fine di decretare l'effettiva formazione dell'addotto ed il mantenimento della capacità antiossidante degli attivi. Tra questi: spettroscopia FT-IR, titolazione via cromatografia HPLC, test di cessione, velocità di sedimentazione, potenziale Z e particle size.

L'addotto viene in seguito inserito all'interno di un'emulsione base al fine di studiarne l'applicabilità. A ciò seguono ulteriori verifiche sul prodotto finito, misurandone pH, densità, viscosità, centrifugazione, attività antiossidante via metodo DPPH e stabilità del composto nel tempo e a diverse condizioni.

Nonostante i dati ottenuti dall' HPLC denotino una buona funzionalizzazione del chitosano ($25.7\pm 6.5\%$), l'analisi spettrale indica una maggiore funzionalizzazione dell'acido ascorbico nei confronti di quella quasi minima della vitamina PP, la quale è stata esclusa dalle analisi successive.

Dai risultati ottenuti è possibile citare come la funzionalizzazione abbia portato ad una aumentata stabilità nei riguardi delle particelle più piccole attraverso le matrici oleose scelte per la misura della velocità di sedimentazione, la scala micrometrica delle particelle ed un mantenimento del potere antiossidante significativamente migliore al termine dei test di invecchiamento confermate delle caratteristiche organolettiche dell'emulsione e dal test del DPPH.

1. INTRODUZIONE

1.1. Pelle

La pelle, o cute, fa parte dell'apparato tegumentario insieme ai suoi derivati: peli, unghie e ghiandole. Rappresenta l'apparato più esteso del nostro corpo e si trova quasi interamente sotto i nostri occhi quotidianamente: quando ci laviamo, spazzoliamo i capelli o applichiamo cosmetici. Tali comportamenti modificano l'aspetto e le proprietà della pelle.

La cute presenta due componenti: l'epitelio di superficie, detto epidermide, e il connettivo sottostante, detto derma. Sotto il derma, l'ipoderma, uno strato connettivo lasso, separa la cute dalla fascia profonda che riveste gli organi, quali muscoli e ossa.

1.1.1. Epidermide

L'epidermide è a sua volta suddivisa in quattro strati. [Figura 1]

- ❖ Lo strato basale è il più interno ed è chiamato anche strato germinativo; questo strato è strettamente adeso alla lamina basale che separa l'epidermide dal tessuto di connettivo lasso del sottostante derma. È caratterizzato dalla presenza di cellule basali, o staminali, e dai melanociti. I melanociti si trovano dispersi tra le cellule basali e, attraverso numerosi processi citoplasmatici, sono in grado di produrre ed iniettare melanina, un pigmento nero, dorato o marrone, nell'epidermide. La presenza di tale pigmento giustifica la colorazione più scura dell'epidermide in confronto al derma. A seconda della zona dell'organismo presa in considerazione, il rapporto tra cellule basali e melanociti varia da 4:1 fino a 20:1. Infine, nella cute sprovvista di peli, troviamo anche i corpuscoli di Merkel e di Meissner. I primi sono recettori a lento adattamento che, in seguito a pressione o dolore, rilasciano sostanze in grado di stimolare le terminazioni nervose sensitive, trasducendo informazioni di tipo tattile. I secondi sono invece recettori a rapido adattamento in grado di trasdurre informazioni tattili riguardo la percezione fine, vibrazione e trazione cutanea.
- ❖ Lo strato spinoso è caratterizzato dalla prima differenziazione dei cheratinociti. Ogni cheratinocita possiede fasci di filamenti proteici chiamati tonofibrille che iniziano e terminano a livello delle maculae adherentes, i quali legano i citoscheletri dei cheratinociti conferendo spessore allo strato e rinforzando le giunzioni cellulari. È comune trovare melanociti, come pure le cellule di Langerhans, le quali possiedono il ruolo di attivare la

difesa immunitaria contro agenti patogeni penetrati attraverso gli strati superficiali o cellule epidermiche tumorali.

- ❖ Lo strato granuloso è costituito da cheratinociti provenienti dallo strato spinoso i quali, in loco hanno sviluppato la capacità di sintetizzare grandi quantità di cheratoialina e cheratina. Granuli di cheratoialina circondano i filamenti di cheratina. I cheratinociti di questo strato contengono anche granuli avvolti da membrana, che rilasciano una sostanza ricca di lipidi, la quale comincia a rivestire le cellule dello strato granuloso, formando uno strato idrorepellente intorno alle cellule degli strati più superficiali dell'epidermide, proteggendola.

- ❖ Lo strato lucido è uno strato amorfo che si trova nella cute spessa del palmo delle mani e della pianta dei piedi a ricoprire lo strato granuloso. Ci si trovano cellule appiattite prive di nucleo e organuli, strettamente adese tra loro e ripiene di filamenti di cheratina disposti parallelamente alla superficie della cute. (1)

- ❖ Lo strato corneo è lo strato superficiale, è costituito da numerosi strati di cellule morte con plasmalemma, chiamate corneociti, che si presentano inspessite, disidratate e appiattite ma ancora ricche di cheratina. Tali cellule si desquamano in strati, e non singolarmente, poiché mantengono le interconnessioni formate nello strato spinoso. L'epitelio, data l'ampia quota di cheratina presente è detto cheratinizzato o corneificato. Normalmente è relativamente asciutto e ciò rende difficile la crescita di molti microorganismi. I corneociti sono legati tra loro dal cemento corneocitario, che sigilla gli spazi presenti tra le cellule e rende lo strato impermeabile. Il cemento corneocitario è formato da lipidi, la cui sintesi avviene nei cheratinosomi. Essi secernono vescicole ricche di tali lipidi, tra cui fosfolipidi, colesterolo, glucosil-ceramidi, enzimi, proteina non enzimatiche e molecole con attività antimicrobica.

L'efficienza di questa barriera è mantenuta dalla continua secrezione delle ghiandole sebacee e sudoripare. Lo strato corneo è resistente all'acqua ma non impermeabile. Le ghiandole sebacee, che si trovano nel derma, sintetizzano e, mediante secrezione olocrina, attraverso il fusto pilifero, rilasciano il sebo, una miscela lipidica formata da gliceridi, acidi grassi liberi, monoesteri cerosi ed esteri del colesterolo. Le percentuali dei componenti variano in funzione dell'area in cui si trovano disposte le ghiandole. Il secreto lipidico ha la

funzione di lubrificare le superfici cutanee e inibire la crescita batterica. Le cellule dell'epidermide, morte e cheratinizzate, una volta sposte all'aria diventano fragili e secche; il sebo lubrifica e protegge la cheratina.

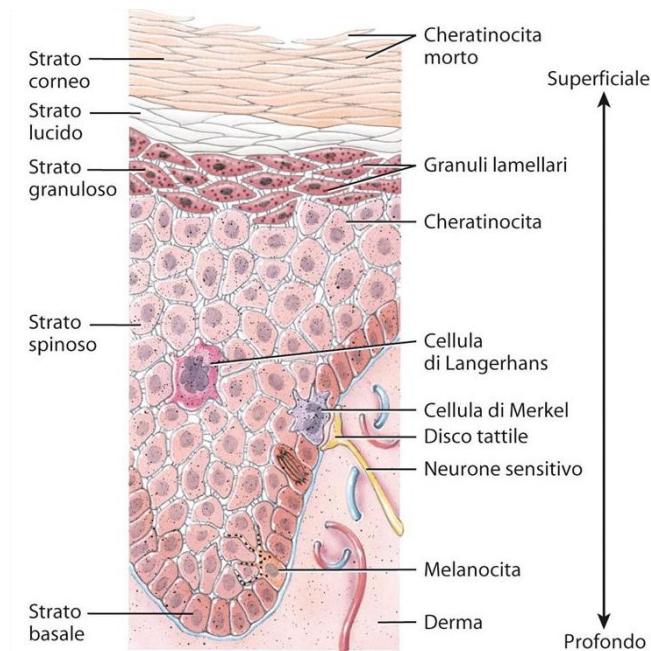


Figura 1. *Suddivisione in strati dell'epidermide*

1.1.2. Derma

Il derma si trova sotto l'epidermide ed è costituito da due componenti: lo strato papillare superficiale e lo strato reticolare più profondo.

Lo strato papillare consiste di tessuto connettivo lasso e contiene sia i capillari che riforniscono l'epidermide sia le terminazioni periferiche dei nervi sensitivi che innervano i recettori dello strato papillare e dell'epidermide.

Lo strato reticolare, più profondo, è costituito da reticolo fibroso intrecciato di tessuto connettivo denso irregolare che circonda i vasi sanguigni, i follicoli piliferi, i nervi e le ghiandole sudoripare e sebacee. Gruppi di fibre di collagene risalgono dal derma reticolare verso il derma papillare, cosicché non esista una distinzione netta tra i due strati. Le fibre di collagene si estendono anche nello strato sottostante sottocutaneo [Figura 2]. Nello strato più

interno del derma si trovano i corpuscoli di Ruffini e di Paccini ed Entrambi sono meccanocettori. I corpuscoli di Ruffini sono a adattamento lento e vengono attivati sulla base di stiramento della cute o dal calore, fino ai 45°C mentre quelli di Pacini sono recettori ricoperti da strati concentrici connettivali ad adattamento rapido che rispondono a stimoli pressori e vibratori.

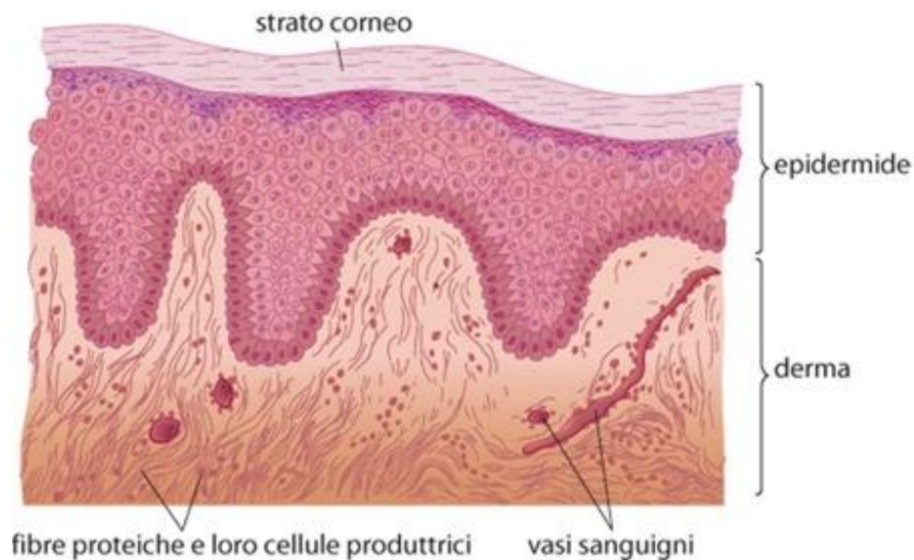


Figura 2. Derma ed Epidermide

1.1.3. Ipoderma

Le fibre del tessuto connettivo del derma reticolare si intrecciano con quelle del sottostante strato sottocutaneo, anche detto fascia superficiale o ipoderma. Lo strato sottocutaneo svolge il ruolo di stabilizzare la posizione della cute rispetto ai tessuti sottostanti, come muscoli scheletrici o altri organi, permettendone movimenti indipendenti. L'ipoderma è costituito da tessuto connettivo lasso contenente molte cellule adipose, le quali vanno a formare il tessuto adiposo. Tale tessuto possiede diverse funzioni tra cui: riserva energetica, termoregolazione e protezione meccanica. Il tessuto adiposo secerne anche decine di diverse adipochine, le quali possono essere suddivise sulla base delle loro caratteristiche funzionali. Le adipochine sono responsabili delle interazioni tra il tessuto adiposo, il tessuto muscolare, i surreni e il sistema nervoso centrale e simpatico. Esse inoltre contribuiscono al controllo del bilancio energetico dell'organismo e della sensibilità all'insulina, e alla regolazione della pressione arteriosa, della risposta immunitaria, dell'angiogenesi, del metabolismo lipidico e dell'emostasi: costituiscono quindi un network di regolazione dell'infiammazione, dell'attività insulinica e del

metabolismo glucidico a livello locale e sistemico.(2) La porzione superficiale contiene vasi arteriosi e venosi mentre quella inferiore solo un piccolo numero di capillari ed è privo di organi vitali. Ciò rende l'iniezione sottocutanea un metodo utile di per la somministrazione di farmaci.

1.2. Nanoparticles biopolimeriche

Nelle ultime decadi sono stati studiate e ricercate diverse modalità per sfruttare l'utilizzo di nanoparticelle (NPs) per una migliore e più efficiente somministrazione di principi attivi nell'ambito della farmacologia (3) e con diversi impieghi anche in ambito cosmetico.

Le nanoparticelle polimeriche sono nanoparticelle, solitamente sferiche, con un diametro compreso tra i 10 e i 100nm, le quali sono prodotte sulla base di polimeri di varia natura e possono essere caricate di principi attivi sia a livello della superficie sia nel core. Esistono sotto forma di nanocapsule o di nanosfere: nelle prime il principio attivo è contenuto all'interno di una cavità centrale racchiusa da una membrana polimerica mentre nelle seconde è disperso uniformemente nell'intera matrice polimerica.

Le modalità di rilascio del principio attivo sono condizionate da diversi fattori, tra cui le proprietà chimico-fisiche e meccaniche del polimero scelto per la preparazione della nanoparticella e dalle tecnologie di formulazione.

Il vasto bacino di polimeri a disposizione per la formulazione, unito alle possibilità di modificarne la composizione della matrice polimerica, ci permette di sviluppare molteplici veicoli di somministrazione con diverse caratteristiche riguardanti il controllo del rilascio del farmaco nel tempo.

1.2.1. Metodi e Polimeri utilizzati nella formazione delle nanoparticles

I metodi utilizzati per la formazione delle particelle biopolimeriche sono molti e dipendono sia dal polimero scelto che dal tipo di particella che si vuole sintetizzare cioè nanosfera o nanocapsula. I più utilizzati per le nanosfere sono: evaporazione del solvente, emulsificazione da diffusione del solvente e nanoprecipitazione; per le nanocapsule invece la nanoprecipitazione rimane il più usato.

Il metodo basato sull'evaporazione del solvente è stato il primo metodo utilizzato per la sintesi di nanoparticelle e richiede l'utilizzo di un polimero preformato (4). In questo processo c'è la necessità di formare in primo luogo un'emulsione olio in acqua utilizzando due fasi: una

organica in cui è presente un solvente organico polare nel quale è dissolto il polimero e il principio attivo incluso attraverso dispersione o dissoluzione e una fase acquosa costituita da acqua e tensioattivi. Le due fasi vengono emulsionate attraverso sonicazione cedendo una dispersione di nanogocce. In seguito, l'evaporazione del solvente viene attuata attraverso o una continua agitazione magnetica a temperatura ambiente (come nel caso di solventi più polari) o più lentamente attraverso riduzione della pressione interna. (5) [Figura 3]

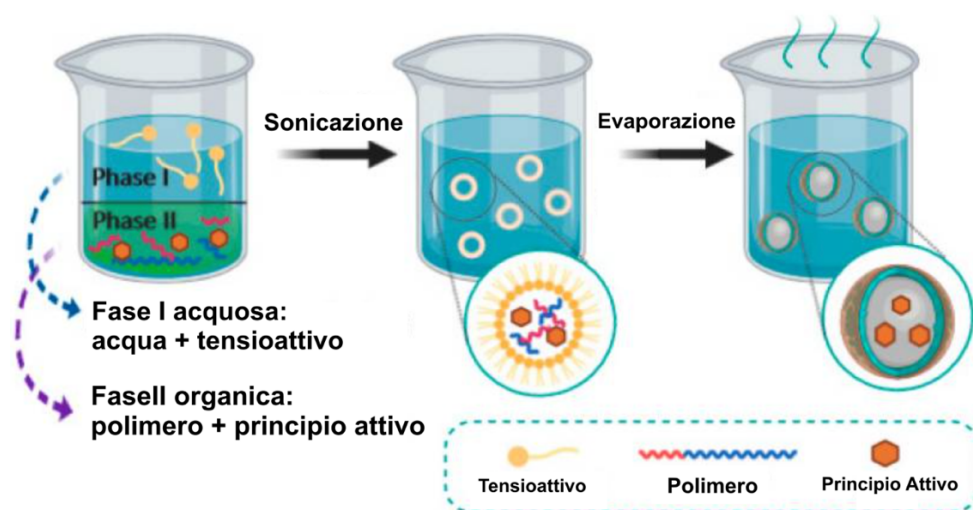


Figura 3. Metodo di evaporazione del solvente per la produzione di NP's

Per quanto riguarda invece l'emulsificazione da diffusione del solvente, si parte dalla sintesi di un'emulsione olio in acqua tra un solvente semi-solubile in acqua contenente il polimero e il principio attivo, e una soluzione acquosa con il tensioattivo. A questo punto si effettua una diluizione con una grande quantità d'acqua in modo che venga indotta una diffusione del solvente sotto forma di goccioline dalla fase interna verso la fase esterna con la formazione di particelle colloidali. Solitamente questo metodo è utilizzato per la formazione di nanosfere ma con l'aggiunta di olii, come ad esempio trigliceridi, alla fase oleosa è possibile anche la sintesi di nanocapsule. Infine, a seconda della temperatura di evaporazione del solvente, quest'ultima fase può essere eliminata attraverso evaporazione o filtrazione. Tale metodo, seppure necessita di grandi quantità d'acqua e il rischio di diffusione di principi attivi idrofili consente ottenimento di nanoparticelle di dimensioni variabili tra gli 80 e 900nm. (6) [Figura 4]

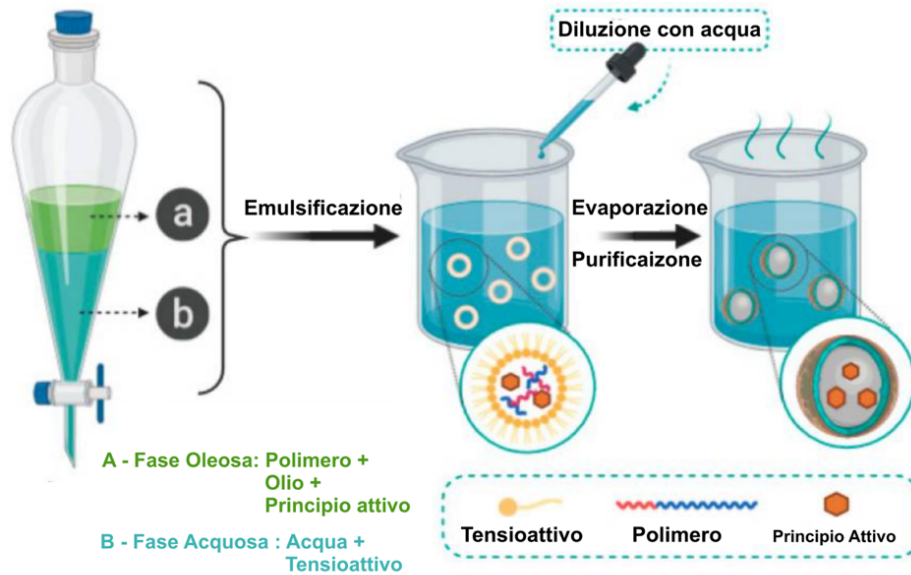


Figura 4. Metodo di emulsificazione del solvente per la produzione di NP's

Infine, per quanto riguarda la nanoprecipitazione, bisogna avvalersi di due solventi miscibili. Si ha una fase interna con il polimero solubilizzato in un solvente organico, come acetone o acetonitrile. Vista la non miscibilità in acqua, essi possono essere rimossi facilmente tramite evaporazione. Il principio di questa tecnica si basa sulla deposizione interfacciale di un polimero dopo lo spostamento del solvente organico da una soluzione lipofila alla fase acquosa. Il polimero è dissolto in un solvente miscibile con acqua e questa soluzione è aggiunta progressivamente in una soluzione acquosa, sotto agitazione con un flusso predefinito. Le nanoparticelle si formano istantaneamente data la veloce e spontanea diffusione della soluzione con il polimero nella fase acquosa e la necessità di evitare le molecole d'acqua. Solitamente è la fase oleosa ad essere introdotta in quella acquosa ma il processo può essere anche invertito e inoltre è solito aggiungere un tensioattivo in modo da garantire la stabilità della sospensione. Queste NP's sono tipicamente definite da una maggiore uniformità della forma e nella dimensione a confronto di quelle date dai processi visti precedentemente; il processo è utilizzato per la produzione NP's con dimensioni che si aggirano tra i 170nm. Quando si vogliono ottenere nanosfere si dissolve il principio attivo nella soluzione polimerica mentre per le nanocapsule, il principio attivo è dissolto in olio, che viene successivamente emulsionata nella soluzione polimerica prima che la fase interna venga dispersa in quella esterna. (7) [Figura 5]

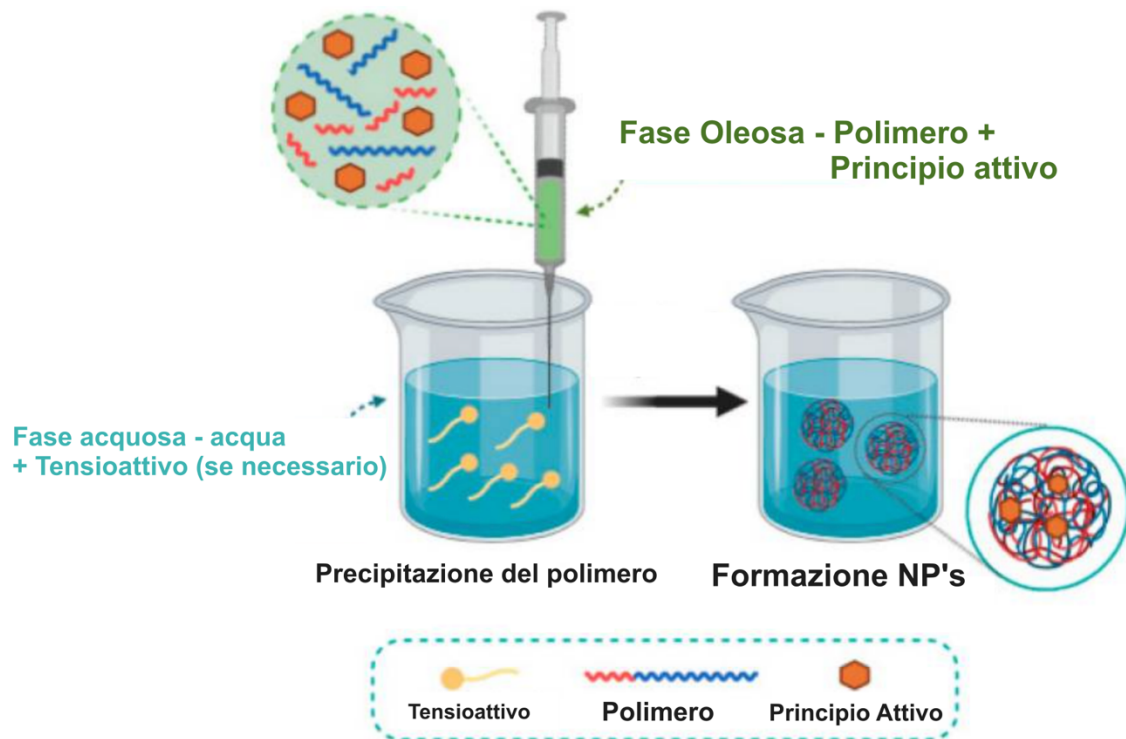


Figura 5. Metodo di nanoprecipitazione per la produzione di NPC's

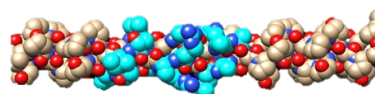
I materiali polimerici di possibile utilizzo in campo farmaceutico devono soddisfare diverse fondamentali caratteristiche. È essenziale che essi siano biocompatibili, in modo da essere totalmente tollerati dall'organismo e in modo da evitare la comparsa di effetti emo- e citotossici o di reazioni immunogeniche. Risulta quindi fondamentale che essi siano liberi da additivi, solventi o residui di sintesi in quanto la tossicità è solitamente associata alla liberazione di tali molecole solubili e la loro interazione con le macromolecole organiche. (8) (9) È necessario, inoltre, che l'organismo sia in grado di eliminarli in tempi brevi per evitare fenomeni di accumulo. Nella formulazione viene preferito l'utilizzo di polimeri biodegradabili, in modo da fornire cataboliti funzionali ad ulteriori reazioni metaboliche o adatte alla clearance renale. L'utilizzo di polimeri non biodegradabili è accettabile solamente nel caso in cui il polimero possieda un peso molecolare inferiore al limite di escrezione renale. (10)

I polimeri a disposizione per la formulazione di nanoparticelle si suddividono tra naturali e sintetici. [Tabella 1]

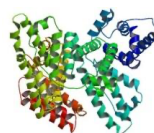
Polimeri	Struttura chimica
----------	-------------------

Polimeri Naturali

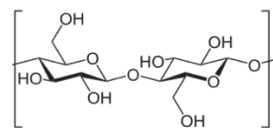
Proteine Collagene, Gelatina



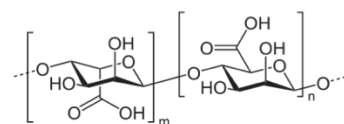
Albumina



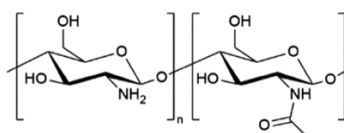
Polisaccaridi Cellulosa



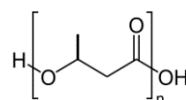
Alginato



Chitina/Chitosano

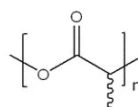


Poliidrossialcanoati Poli(β-idrossibutirrato)



Polimeri Sintetici

Poliesteri Poli(acido lattico) (PLA)



	Poli(acido glicolico) (PGA)	
	Poli(ε-caprolattone) (PCL)	
Polianidridi	Poli(acido sebacico) (PAS)	

Tabella 1: Principali polimeri utilizzati per la formulazione di nanoparticelle

1.2.2. Chitosano

2.2.2.2. Chitina

La chitina è un polisaccaride naturale formato da due monomeri: D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, uniti da legami β-1,4-glicosidici. Questo polimero è sintetizzato da un enorme numero di organismi viventi e ciò la rende il polimero naturale più abbondante dopo la cellulosa. In base alla fonte dalla quale la chitina viene estratta, si può presentare in due forme allomorfe differenti: la forma α e la forma β; tali possono essere riconosciute attraverso analisi infrarossi e spettrometria NMR. Allo stato solido, le catene di chitina sono legate tra loro da legami H che controllano la solubilità e la reattività del composto. L'isoforma α è la più abbondante e si trova nelle pareti cellulari di funghi e lieviti, nei tendini di krill, aragoste e granchi e nei gusci di gamberetti, nonché nella cuticola degli insetti. In base alla specie di crostaceo, il guscio possiede una quantità di chitina che varia in un range tra il 6-72%. Si forma attraverso un processo di ricristallizzazione di soluzioni di cutina. L'isoforma β, molto più rara, si trova in associazione a proteine nei gladi dei calamari. Secondo le analisi cristallografiche dei due composti, si può concludere che per ogni cellula unitaria, per l'isoforma α troviamo

due molecole disposte in maniera antiparallela, mentre per l'isoforma β se ne trova una sola in disposizione parallela. (11)

L'estrazione della chitina mediante trattamenti chimici presenta numerosi inconvenienti: danneggia le proprietà fisico-chimiche della chitina e porta a una diminuzione del peso molecolare che influisce negativamente sulle proprietà intrinseche della chitina purificata; inoltre aumenta il costo dei processi di purificazione della chitina. L'estrazione si basa su una serie di processi che includono la demineralizzazione con acido cloridrico (HCl) e deproteinazione con sodio idrossido (NaOH). La chitina è insolubile in diversi solventi per cui la ricerca ha sviluppato un metodo di ottenere un derivato più solubile attraverso una N-deacetilazione [Figura 6], la quale converte la chitina in chitosano. (12)

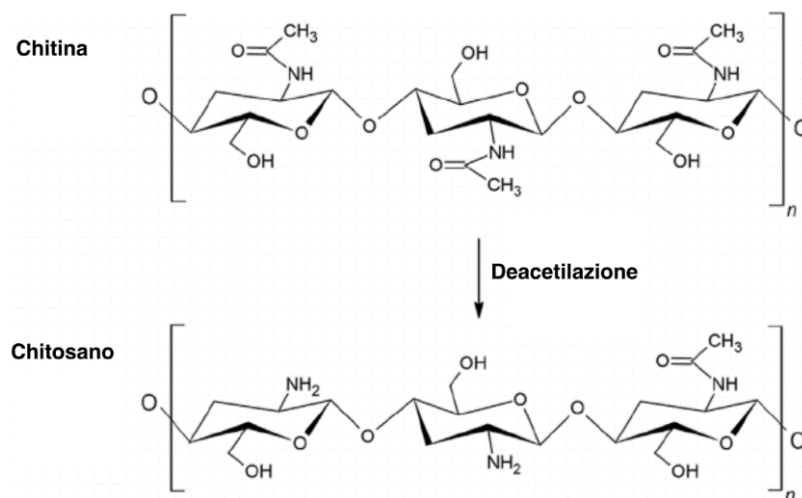


Figura 6. Processo di sintesi del chitosano dalla chitina via N-deacetilazione

Il chitosano è un polisaccaride eteropolimero dato da unità di 2-acetamido-2-desossio-D-glucopiranosio e 2-amino-2-deossio-D-glucopiranosio, unite tra loro da legami β -1,4-glicosidici. Tuttavia, questa molecola è ritenuta tale, solo nel momento in cui più del 50% dei monomeri presenti si trovano nella forma di 2-amino-2-deossio-D-glucopiranosio.

2.2.2.2. Proprietà del chitosano

Grazie a tale percentuale, la molecola assume caratteristiche chimico-fisiche di notevole rilevanza, tra cui il peso molecolare, il grado di deacetilazione, il grado di cristallinità e la

solubilità, possono essere modificate in base alle proprietà biologiche ricercate. Le tecniche analitiche riportate in letteratura per la valutazione del grado di deacetilazione sono diverse, tra cui spettroscopia IR e titolazione acido-base in quanto i gruppi amminici in catena, sono completamente protonati in soluzioni acquosa con $\text{pH} < 6,2$. (13)

A differenza della chitina, il chitosano è solubile in acqua in condizioni acide (pH inferiore a 6) [Figura 7] per effetto della protonazione dei gruppi amminici (pK_a pari a 6.3), che conferisce al polimero una carica netta positiva. (14)

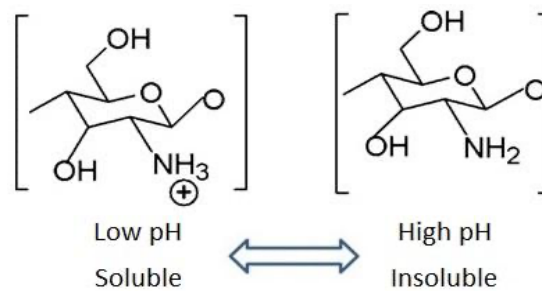


Figura 7. Relazione tra pH e chitosano

Le proprietà biologiche del chitosano consistono in: bassa tossicità, capacità di essere biodegradato velocemente ed alta biocompatibilità.

Le nanoparticelle di chitosano sono particolarmente interessanti in quanto possiedono: carica positiva in superficie, la capacità di aprire le giunzioni strette che si trovano tra le cellule e proprietà mucoadesive, in caso di somministrazione parenterale. Sono infatti nanoparticelle molto studiate per la capacità di veicolare principi attivi, soprattutto come carriers di farmaci a somministrazione orale in quanto riducono il metabolismo gastro-intestinale e, grazie alla loro mucoadesione, facilitano il legame alla mucosa intestinale.

Il chitosano ha la capacità di agire come polimero ricopribile (coating) da altre molecole o principi attivi, oppure può anche agire esso stesso da core della nanoparticella [Figura 8]

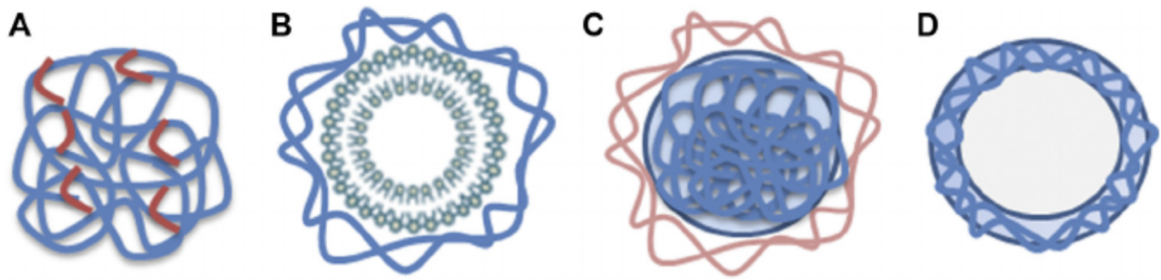


Figura 8. (A) Nanosfera di chitosano (blu) e cross-linker (rosso) - (B) Liposoma (verde) ricoperto di chitosano (blu) - (C) Nanoparticella di chitosano (blu) coperta di un'altra sostanza come un polimero o una proteina - (D) Nanocapsula di chitosano

2.2.2.2. Utilizzi in ambiente biomedico e farmaceutico

Il chitosano, grazie alle proprie caratteristiche di biodegradazione e biocompatibilità, viene utilizzato in molti ambiti specifici medici e biotecnologici.

Il polimero viene facilmente degradato attraverso idrolisi enzimatica da enzimi proteolitici come i lisosomi, che si trovano comunemente nei tessuti. Allo stesso modo, le lipasi presenti nello stomaco, nei fluidi pancreatici o nella saliva sono in grado di solubilizzare il chitosano. (15)

Il contatto dei gruppi aminici del polimero con i gruppi acidi posseduti dalle cellule ematiche porta alla formazione di coaguli, come conseguenza della risposta trombogenica. Il meccanismo consiste nell'adsorbimento del plasma sulla superficie del chitosano seguito dall'adesione e dall'attivazione delle piastrine che inducono la formazione del trombo. (16)

Il chitosano possiede ottime possibilità di utilizzo anche come agente ipocolesterolemizzante e ipoglicemico, capace quindi di ridurre il rischio di patologie cardiovascolari. Inoltre, è stato mostrato ulteriore interesse anche per le proprie capacità antimicrobiche e antiossidanti, che amplia la gamma dei possibili utilizzi del chitosano a spugne biodegradabili, strumenti per le suture chirurgiche, membrane, microsfele e compresse. (17)

Applicazioni biomediche e farmaceutiche

Antiossidante e antimicrobico
Ferite e ustioni
Somministrazione di principi attivi
Oftalmologia
Cosmetica

Tabella 2: Applicazioni biomediche e Farmaceutiche

Antiossidante e antimicrobico

I batteri gram positivi possiedono una membrana formata da uno spesso strato di peptidoglicano dove gli acidi tecoici, caricati negativamente, sono legati covalentemente all'acido N-acetilmuramico; d'altra parte, gli acidi lipoteicoici danno vita a legami covalenti con la membrana citoplasmatica. (18)

Nel caso dei gram negativi invece abbiamo uno strato fino di peptidoglicano al di sopra della membrana citoplasmatica, la quale è ricoperta da un'ulteriore membrana chiamata membrana esterna. Essa è formata principalmente da lipoproteine e lipopolisaccaridi (LPS). Le catene idrofiliche dei LPS sono spesso siti di riconoscimento del batterio. Le macromolecole e i composti idrofobici non sono solitamente attivi nei riguardi di batteri gram negativi, tuttavia il chitosano, attraverso un'interazione che modifica le proprietà della membrana esterna, causando una perdita di contenuti intracellulari o l'impossibilità di approvvigionamento di nutrienti esterni, riesce a contrastare parte dei batteri [Figura 9]. (18,19)

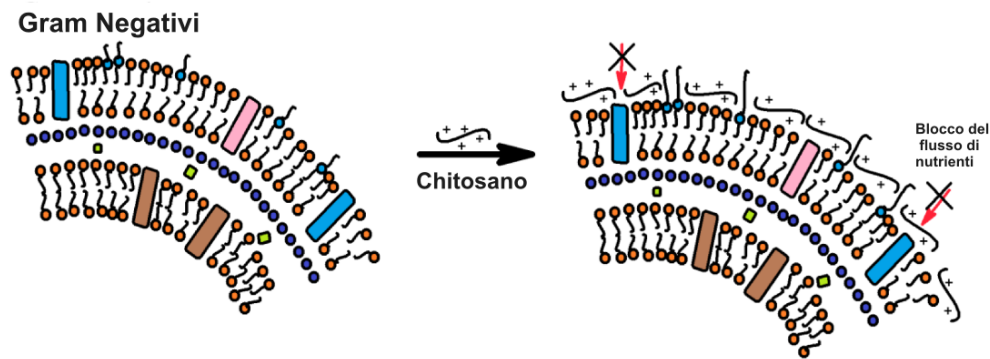


Figura 9. Meccanismo d'azione sui Gran negativi del Chitosano

A causa della bassa solubilità del chitosano, le proprietà antimicrobiche non sono così efficienti, tuttavia, attraverso la funzionalizzazione con appropriati gruppi funzionali come ammoni quaternari, catene carbossialchiliche o idrossialchiliche, è possibile ottenere una maggiore solubilità; quindi, la proprietà antimicrobica è fortemente incrementata. (20,21)

Ferite e ustioni

La guarigione da ferite e ustioni è un processo biologico legato al ripristino, attraverso la rigenerazione, dei tessuti cutanei. I cinque processi sono in ordine: omeostasi, infiammazione, migrazione, proliferazione e maturazione. (22) Vari derivati del chitosano hanno dimostrato, in vitro ed in vivo, ottime capacità di bioassorbimento, biocompatibilità e biodegradazione.

<i>Derivati del Chitosano</i>	<i>Caratteristiche - Attività dimostrata</i>
Glicerol-acido oleico-chitosano	Buona cito-compatibilità e biocompatibilità, ottimo bioassorbimento e possibilità di rilascio prolungato di principio attivo
Ag-chitosano	Buon agente antibatterico
Cu-Chitosano e ZnO-Chitosano	Buone capacità di guarigione di ferite grazie alla promozione di deposito di collagene, proliferazione di fibroblasti e riepitelializzazione
Chitosan-chitina + Melatonina	Nanoparticelle capaci di favorire la proliferazione epiteliale della ferita, grazie anche ad un rilascio di melatonina
Chitosan-TiO ₂ -N-vinilpirrolidone	Natura idrofila con buona biocompatibilità, attività antimicrobica e antibatterica, capacità di rigonfiamento e capace di migliorare esteticamente l'aspetto della ferita

Tabella 3: Derivati del chitosano e caratteristiche

Drug delivery

Lo sviluppo di farmaci è un processo complesso in quanto molti principi attivi non sono in grado di raggiungere l'efficacia terapeutica necessaria sulla base dei risultati ricercati e inoltre, una grande quantità di essi, vengono tutt'al più distribuiti in organi e tessuti la cui presenza non è necessaria alla terapia della patologia e ciò porta spesso a gravi effetti collaterali.

Il chitosano, grazie alle proprietà intrinseche di bioadattabilità, possiede un gran potenziale come eccipiente nella formulazione di perle, matrici e biofilm per granuli, microgranuli e compresse.

Membrane e film possono essere sintetizzati attraverso la modulazione delle caratteristiche idrofiliche attraverso la formazione di miscele o reti semi-interpenetrate e compenstrate di

chitosano con polimeri altamente idrofili come alcol polivinilico, polivinilpirrolidone o gelatina, che hanno un rigonfiamento controllato. (23)

<i>Farmaco</i>	<i>Forma farmaceutica</i>
Aspirina	Granuli da granulazione ad umido
Clorfenamina Maleato	Compresse
Dapsone	Gel
Ossifenilbutazone	Compresse rivestite
Prednisolone	Granuli
Pullulan	Film

Tabella 4: Farmaci la cui formulazione include il chitosano tra gli eccipienti

Tra i vari sistemi basati sul chitosano, troviamo microsfele di chitosano, alginato, polietileglicole le quali sono state classificate come un mezzo potenzialmente sfruttabile per la somministrazione di principi attivi a basso peso molecolare come l'eparina. (24) Allo stesso modo, nanoparticelle di chitosano sono state utilizzate per la somministrazione per via nasale di vaccini e farmaci grazie alla capacità di penetrazione dei principi attivi attraverso la barriera nasale. (25)

Oftalmologia

Il chitosano possiede svariate applicazioni interessanti anche nel mondo dell'oftalmologia grazie a: stabilità meccanica, permeabilità ai gas (parziale nei confronti dell'ossigeno), bagnabilità, chiarezza ottica, resistenza allo strappo e alla torsione, capacità di allungamento; ciò lo rende un biopolimero dalle caratteristiche utili per la produzione di lenti a contatto. (26)

Cosmetica

Il chitosano è l'unico polimero cationico naturale che, venendo neutralizzato con una soluzione acida, diventa viscoso. Ciò, unito alle proprie capacità fungicida e fungistatiche, ne favorisce l'uso in creme, lozioni e smalti. (27)

1.3. Acido Ascorbico e Sodio Ascorbato

L'enantiomero L dell'acido ascorbico è comunemente conosciuto con il nome di vitamina C ((5R)-[(1S)-1,2-diidrossietil]-3,4-diidrossifuran-2(5H)-one), come tale o come sale L-ascorbato. [Figura 10].

Fa parte del gruppo delle vitamine idrosolubili e svolge un ruolo chiave nel mantenimento dei processi fisiologici del nostro organismo.

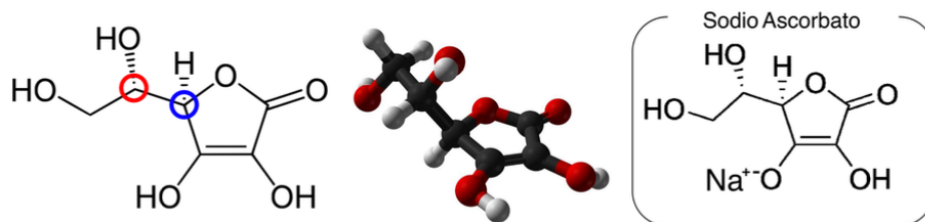


Figura 10. Struttura chimica dell'acido ascorbico e del suo sale sodico

L'acido ascorbico si presenta sotto forma di polvere cristallina bianca fortemente idrosolubile (0.33g/mL), la quale genera una soluzione debolmente acida (pKa1 = 4.17; pKa2 = 11.6). (28)

La proprietà principale della molecola sta nella propria tendenza ad ossidarsi, la quale fa di sé un ottimo riducente, quindi antiossidante. In presenza di ossigeno atmosferico o ioni metallici la reazione porta alla formazione di acido deidroascorbico (DHA). [Figura 11]

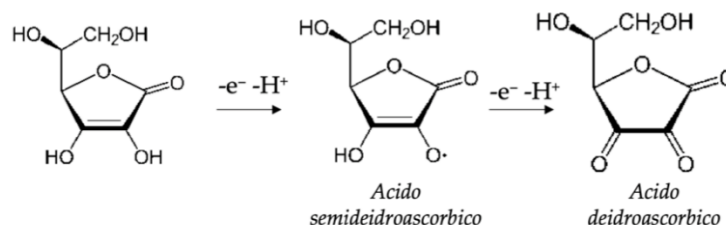


Figura 11. Reazione di ossidazione dell'acido ascorbico

L'acido ascorbico possiede un ruolo fondamentale nel mantenimento della salute della pelle in quanto promuove la differenziazione dei cheratinociti e diminuisce la sintesi di melanina, fornendo un'azione protettiva contro il danno indotto dai raggi UV. In condizioni fisiologiche,

la pelle necessita di alte concentrazioni di vitamina C, circa 80mg introdotti con la dieta, la quale promuove la formazione di collagene, contrasta i danneggiamenti cutanei causati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e modula le vie dei segnali cellulari riguardanti la crescita cellulare e la differenziazione. (29)

L'acido ascorbico viene trasportato nell'organismo attraverso due trasportatori attivi sodio-dipendenti: SVCT1 e SVCT2. Essi presentano sia una diversa distribuzione nei tessuti sia una diversa cinetica di captazione del ligando.

SVCT1 è presente principalmente nei tessuti epiteliali, ed è responsabile dell'assorbimento intestinale e del riassorbimento renale. SVCT2 agisce invece nei tessuti specializzati come il tessuto connettivo e tegumentario, fondamentale per le reazioni enzimatiche che coinvolgono l'azione antiossidante. [Figura 12]

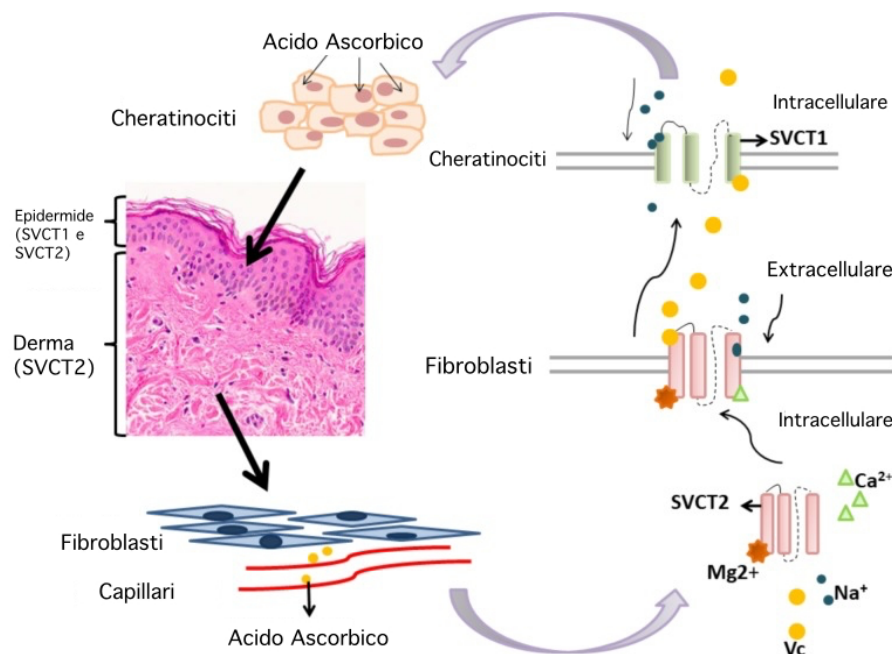


Figura 12. Trasporti attivi dell'acido ascorbico da parte di SVCT1 e SVCT2

Il normale metabolismo cellulare porta alla formazione di prodotti secondari di reazione tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tra queste abbiamo radicali superossidi ($O_2^{\cdot-}$), ossigeno (O_2), perossido di idrogeno (H_2O_2) e radicali idrossilici (OH^{\cdot}). Il problema di tali specie sta nella loro capacità di dare inizio ad una cascata di formazione di radicali idrossilici, i quali possono portare a danni nei confronti di altre molecole come proteine, DNA e causare

perossidazione lipidica; essi portano la cellula all'apoptosi. Nel momento in cui la fisiologica difesa antiossidante nei confronti di tali specie non riuscisse ad eliminare del tutto le molecole danneggiate, viene a generarsi lo stress ossidativo. I ROS, tuttavia, possono essere eliminati anche attraverso vie non enzimatiche; tra queste vie, l'azione di molecole ad alta attività antiossidante come l'acido ascorbico aiutano a prevenire lo stato di stress ossidativo. L'acido ascorbico è infatti la molecola naturale con maggior 'attività antiossidante e minori effetti collaterali, capace di ridurre i livelli di perossidazione lipidica in vivo, dati dal fisiologico processo di invecchiamento della cute. (30)

In modo che l'acido ascorbico possa esplicare efficacemente la propria azione antiossidante deve essere veicolato in maniera tale da non perdere le proprie condizioni di stabilità. Tuttavia, esso è un composto molto instabile all'aria, alla luce, all'umidità, ad alte temperature e ovviamente all'ossigeno e gli ioni metallici. Esso si decompone in diversi composti biologicamente inattivi come acido ossalico, acido treonico, acido xilonico e acido lixonico.

Nel corso di questo lavoro di ricerca verrà approfondito l'utilizzo sia dell'acido ascorbico come tale, sia del proprio sale sodico.

Il sodio ascorbato [Figura 13], infatti, presenta caratteristiche di stabilità migliori, soprattutto nei confronti di temperature elevate e ossigeno, le quali verranno sfruttate nel corso della ricerca. (31)

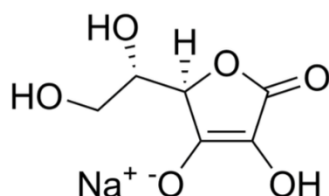


Figura 13. Sale sodico dell'acido ascorbico

1.4. Vitamina PP

La vitamina PP è una vitamina idrosolubile facente parte del complesso della vitamina B3. Il complesso comprende tre elementi: Niacina o acido nicotinico, Nicotinamide (NAM) o niacinamide e nicotinamide riboside (NR). Di fatto, la vitamina PP fa parte dei precursori del nicotinamide adenina dinucleotide (NAD); infatti esso non è sintetizzabile dal nostro organismo in assenza di vitamina PP o triptofano. (32) [Figura 14]

A - Acido nicotinico B - Nicotinamide C - Nicotinamide adenina dinucleotide

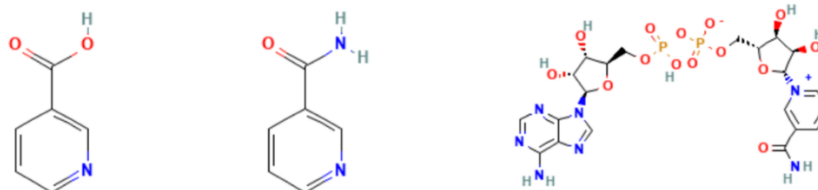


Figura 14. Le tre forme molecolari del complesso Vitamina B3

1.4.1. Il complesso vitamina B3

L'acido nicotinico, o niacina, è una polvere cristallina bianca inodore, dal gusto leggermente acidulo. In soluzione acquosa satura, infatti, il pH è di 2.7. Se somministrata a dosi sufficienti, esplica un effetto terapeutico nei confronti delle dislipidemie, abbassando la concentrazione di lipoproteina a bassa densità (LDL) e aumentando quella di lipoproteine ad alta densità (HDL). (33)

La nicotinamide, o niacinamide, è una polvere bianca cristallina solubilissima in acqua. Agisce funzionalmente come cofattore antiossidante, agente antinfiammatorio e neuroprotettivo; inoltre è anche un agente chemio e radiosensibilizzante che migliora il flusso sanguigno del tumore, riducendo così l'ipossia tumorale (34)

Il NAD, o nicotinamide adenina dinucleotide, è un coenzima ossidoreduztivo la cui principale funzione nell'organismo è di trasportare elettroni necessari nelle vie metaboliche. Proprio perché molti enzimi utilizzano il NAD per le proprie reazioni, negli ultimi decenni, in ambito farmacologico, è stato studiato come target diretto di principi attivi, o progettando enzimi inibitori, o attivatori, in grado di variare la conformazione di enzimi NAD-dipendenti nel momento in cui avviene il legame. (35)

1.4.2. Utilizzi farmacologici della Vitamina PP in dermatologia e cosmetica

In campo dermatologico e cosmetico è possibile utilizzare la niacinamide, oltre che per il suo potere antiossidante, anche per terapie topiche profilattiche o sintomatiche. (36)

In ambito dermatologico, i maggiori utilizzi rientrano nei seguenti campi:

- Profilassi contro tumori alla pelle non melanomatosi

Numerosi RTC (randomized controlled trials) hanno dimostrato come un con dose di nicotinamide di circa 500mg due volte al dì, tale molecola abbia la capacità di ostacolare l'immunosoppressione causata dai raggi UV e prevenire il danno cellulare attraverso il potere antiossidante

- Disturbi da vesciche

La nicotinamide sembrerebbe avere il potere di inibire la via delle citochine pro-infiammatorie e far si di diminuire i disturbi cronici dati dal pemfigoide bolloso. Solo uno studio tuttavia riporta la molecola come principio attivo principale nella terapia di tale condizione.

- Acne

La nicotinamide è stata utilizzata in diversi trials contro l'acne-vulgaris grazie ai suoi benefici antinfiammatori e benefici nella riduzione della produzione di sebo.

- Prurito

Si pensa che la nicotinamide sia in grado di ridurre il prurito attraverso svariati meccanismi d'azione. Tra questi c'è la capacità di stabilizzare i mastociti e quindi ridurre il rilascio d'istamina; in secondo luogo, migliora la produzione di ceramidi cutanee le quali difendono la cute da secchezza e prurito; in ultima si pensa sia in grado di sopprimere l'attività T-helper1 che sembra causare prurito uremico.

- Cosmesi

L'utilizzo di cosmetici contenenti la niacinamide è utile per il suo effetto antiossidante, per il miglioramento della barriera cutanea (regola la produzione di ceramidi), riduzione dell'iperpigmentazione, eritemi e discromie, effetto antinfiammatorio e di controllo sulla produzione di sebo. Studi riportano un'oggettiva riduzione di rughe, lentiggini e un miglioramento dell'elasticità cutanea (37).

In ambito cosmetico viene preferito l'utilizzo della niacinamide, rispetto alla niacina, in quanto essa, interagendo con i recettori nicotinici, può portare a vasodilatazione locale, con segni di rossore e gonfiore, il più delle volte sgradevoli e non desiderati. Molto utilizzati anche gli esteri dell'acido nicotinic, come ad esempio la niacinamide ascorbato, lattato o salicilato, i quali presentato un effetto rubefacente, cioè la proprietà di richiamare una piccola quantità di sangue dallo strato inferiore, utile nei casi in cui si voglia un'inflammatione degli strati inferiori.

1.5 Cosmetici e Dispositivi medici

1.5. Cosmetici

Produzione , confezionamento , distribuzione e vendita di cosmetici sono oggi disciplinati dal Regolamento Europeo 1223/2009, che ha sostituito a partire dall' 11 luglio 2013 la legge italiana 713/1986 (a sua volta recepimento della direttiva 76/768 CEE)

La legge 713/1986 in precedenza, e tuttora il Regolamento 1223/2009, definiscono come prodotti cosmetici “le sostanze e le preparazioni, diverse dai medicinali, destinate ad essere applicate sulle superfici esterne del corpo umano (epidermide, sistema pilifero e capelli, unghie, labbra, organi genitali esterni) oppure sui denti e sulle mucose della bocca allo scopo di esclusivo o prevalente di pulirli, profumarli, modificarne l'aspetto, correggere gli odori corporei, proteggerli o mantenerli in buono stato”. (38)

Il regolamento 1223/2009 presenta 5 allegati (39)

L'allegato I elenca i prodotto che rientrano tra i cosmetici: creme, emulsioni, lozioni, gel, oli, moschere di bellezza, fondotinta, cipria per il trucco, talco per il dopobagno, saponi da toilette, acque di colonia, preparazioni per bagni e docce, prodotti per la depilazione, deodoranti e antisudoriferi, prodotti per la cura e trattamento dei capelli (prodotti per ondulazione, messa in piega, pulizia, coloranti, per l'acconciatura, ...), prodotti per la rasatura, per il trucco e lo strucco del viso, per l'igiene di denti e bocca, per l'igiene intima esterna, per igiene delle unghie e lacche per le stesche, solari, prodotti destinati ad essere applicati sulle labbra, abbronzanti senza sole, prodotti per schiarire la pelle e antirughe.

L'allegato II elenca le sostanze che non possono rientrare nella composizione dei prodotti cosmetici (seguono alcuni esempi estratti dall'aggiornamento 11 luglio 2013 del Regolamento): spironolattone, sostanze ad attività androgena, antibiotici, efedrina e i suoi Sali, nitroglicerina, lidocaina, balsamo del Perù.

L'allegato III presenta le sostanze il cui utilizzo è vietato, salvo in determinati limiti e condizioni. Ad esempio, l'acido borico è una sostanza utilizzabile fino al 5% nei talchi, fino allo 0,1% nei prodotti per l'igiene della bocca e al 3% in altri prodotti se espresso in ac.borico m/m.

L'allegato IV contiene l'elenco dei coloranti che possono essere utilizzati nei cosmetici, suddivisi in permessi in tutti i cosmetici, tutti i cosmetici meno per quelli utilizzati vicino gli occhi o per lo strucco, quelli destinati a non venire a contatto con le mucose e quelli destinati a venire a contatto con la pelle solo brevemente.

L'etichettatura e nomenclatura dei cosmetici richiede di indicare i vari componenti in ordine decrescente di quantità, con la denominazione INCI, generalmente in lingua inglese. A ciò fanno eccezione le sostanze presenti nella Farmacopea Europea, che vengono riportate con la nomenclatura latina, e i componenti vegetali che sono indicati con la tipica denominazione botanica binomiale in latino, eventualmente seguiti dalla parte di pianta usata.

Il più recente inventario delle denominazioni INCI è reperibile nella Gazzetta Ufficiale delle comunità europee L 97/1 del 5.4.2006, nella quale sono presenti anche le funzioni per le quali un ingrediente viene di norma utilizzato nei prodotti cosmetici. (40)

1.5.2 Dispositivi medici

Il dispositivo medico è definito dal REGOLAMENTO (UE) 2017/745 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 5 aprile 2017 relativo ai dispositivi medici, che modifica la direttiva 2001/83/CE, il regolamento (CE) n.178/2002 e il regolamento (CE) n. 1223/2009 e che abroga le direttiva 90/385/CEE e 94/42/CEE del Consiglio dei ministri.

Il “dispositivo medico” è definito come qualunque strumento, apparecchio, apparecchiatura, software, impianto, reagente, materiale o articolo, destinato dal fabbricante a essere impiegato sull'uomo, da solo o in combinazione, per una o più delle seguenti destinazioni d'uso specifiche:

- Diagnosi, prevenzione, monitoraggio, previsione, prognosi, trattamento o attenuazione di malattie,
- Diagnosi, monitoraggio, trattamento, attenuazione o compensazione di una lesione o di una disabilità,
- Studio, sostituzione o modifica dell'anatomia oppure di un processo o stato fisiologico o patologico,
- Fornire informazioni attraverso l'esame in vitro di campioni provenienti dal corpo umano, inclusi sangue e tessuti donati,

e che non esercita nel o sul corpo umano l'azione principale cui è destinato mediante mezzi farmacologici, immunologici o metabolici, ma la cui funzione può essere coadiuvata da tali mezzi.

Si considerano dispositivi medici anche prodotti come i dispositivi per il controllo del concepimento o per il supporto al concepimento e i prodotti specificatamente destinati alla pulizia, disinfezione o sterilizzazione dei dispositivi. (41)

Il regolamento cita inoltre ulteriori specifiche definizioni di dispositivo medico, libere dalla classificazione conforme all'allegato VIII, ma legate all'utilizzo e/o del dispositivo medico. Tra queste, sempre comprese nell'articolo 2, troviamo:

- «accessorio di un dispositivo medico»: prodotto che, pur non essendo esso stesso un dispositivo medico, è destinato dal fabbricante a essere utilizzato con uno o più dispositivi medici;
- «dispositivo su misura»: qualsiasi dispositivo fabbricato appositamente sulla base di una prescrizione scritta di qualsiasi persona autorizzata;
- «dispositivo attivo»: qualsiasi dispositivo il cui funzionamento dipende da una fonte di energia diversa da quella generata dal corpo umano;
- «dispositivo impiantabile»: qualsiasi dispositivo destinato a essere impiantato totalmente nel corpo umano, oppure sostituire una superficie epiteliale o la superficie oculare, mediante intervento clinico e a rimanere in tale sede dopo l'intervento;
- «dispositivo invasivo»: un dispositivo che penetra parzialmente o interamente nel corpo tramite un orifizio del corpo o la superficie corporea.

La classificazione dei dispositivi medici è descritta nell'articolo 51 e tali sono suddivisi nelle classi I, IIa, IIb, III in funzione della destinazione d'uso prevista e dei rischi che comporta. L'allegato VIII tiene conto di destinazione d'uso, rischi connessi all'utilizzo e caratteristiche del dispositivo in termini di durata dell'uso e invasività.

Per durata dell'uso si possono suddividere in temporaneo, a breve termine e a lungo termine. In ordine, l'utilizzo del dispositivo è dato da una durata continua di massimo 60 minuti, tra i minimi 60 minuti e massimo 30 giorni, ed infine superiore a 30 giorni. Inoltre, l'allegato VII specifica che per uso continuo si intende l'intera durata di utilizzo dello stesso dispositivo indipendentemente da un'interruzione temporanea nel corso di una procedura

o la rimozione temporanea per fini quali la pulitura e la disinfezione del dispositivo; il carattere temporaneo dell'interruzione dell'utilizzo o della rimozione è calcolato in relazione alla durata dell'utilizzo precedente e successiva al periodo in cui l'utilizzo è interrotto o il dispositivo è rimosso.

In aggiunta è caratterizzato anche come l'utilizzo complessivo di un dispositivo destinato dal fabbricante a essere immediatamente sostituito da un altro dispositivo dello stesso tipo.

Riguardo l'invasività, conformemente alle regole dell'articolo VIII, si basa sulla destinazione d'uso dei dispositivi.

Il regolamento prevede 4 regole per i dispositivi non invasivi, 4 regole per i dispositivi invasivi, 5 regole per i dispositivi attivi e 9 regole per i dispositivi speciali.

Il prodotto sul quale si basa questo lavoro di tesi sperimentale, nel caso in cui venisse valutato come dispositivo medico rientrerebbe nella sezione riguardo i dispositivi medici non invasivi, come dispositivo medico ad uso cutaneo. Tra le regole che classificano questo tipo di dispositivi, cioè la regola da 1 a 4, tale dispositivo verrebbe classificato come classe I, in quanto viene applicato ed entra in contatto con la pelle ma tale non è lesa, per cui non sottostà alla regola 4.

Rientrano nella categoria di dispositivi medici diversi preparati in commercio per uso dermatologico ad esempio pomate, creme, unguenti, lozioni per scottature, prurito, micosi, per il trattamento di dermatiti, eczemi ,micosi cutanee o onicomicosi, onicodistrofie, emorroidi, ragadi o addirittura prodotti schermanti solari con SPF 100 . Questi preparati agirebbero a livello cutaneo senza la presenza di sostanze farmacologicamente attive ma solo attraverso effetti filmogeni, protettivi , di modificazione del pH cutaneo , ecc.

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1. Strumenti e Materiali

- Strumenti

UV-Vis V-730 (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan), HPLC LC-4000 (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan), H₂O HPLC grade (Merk, Darmstadt, Germany), CH₃CN HPLC grade (Merk, Darmstadt, Germany), EtOH HPLC grade (Merk, Darmstadt, Germany), Netzsch 409/C TGA-DSC (Erich NETZSCH GmbH & Co. Holding KG, Selb, Germany), Nicomp ZLS Z3000 DLS-ELS (Billerica, Massachusetts, USA), LUMiSizer® multisample analytical centrifuge (L.U.M. GmbH, Berlin, Germany), pH meter Seven Compact (Mettler Toledo, OH, Columbus, USA), Densimeter Easy D30 (Mettler Toledo, Columbus, USA), Turbo-emulsifier Silverson L2R (Silverson, Waterside - Chesham, UK), Centrifuge RE.MI XS R-8D (REMI Group, Mumbai, India), Viscometer Brookfield DV2T (Brookfield, Middleboro, MA, USA), DU-65 Digital ultrasonic cleaner (Argolab, Carpi, Italy)

- Materiali

Acqua purificata (INCI: AQUA), Chitosano (INCI: CHITOSAN), Acido Ascorbico (INCI: ASCORBIC ACID), Sodio Ascorbato (INCI: SODIUM ASCORBATE), Vitamina PP (INCI: NIACINAMIDE), Acido acetico glaciale (ACETIC ACID), Trifosfato pentasodico o TPP (INCI: PENTASODIUM TRIPHOSPHATE), Acido cloridrico (INCI: HYDROCHLORIDRIC ACID), Sodio idrossido (INCI: SODIUM HYDROXITE), Acido fosforico (INCI: PHOSPORIC ACID), 2,2-difenil-1-picrilidrazide o DPPH, Olivem 1000 (INCI: Cetearyl olivate, sorbitan olivate), Cetiol C5 (INCI: Coco-Caprylate), Cutina® GMS (INCI: Glyceryl Stearate) Isocide BAS (INCI: BENZYL ALCOHOL, DEHYDROACETIC ACID AQUA(WATER)) , EDTA (INCI: EDTA), Glicerolo (INCI: Glycerin), Lanette O (INCI: Cetearyl Alcohol), Rhodicare T (INCI: XANTHAN GUM).

2.2. Metodi

2.2.1. Sintesi delle nanoparticles

Soluzione 50ml di acqua, chitosano 5mg/ml (250mg), acido acetico 1M 3ml a 60°C. In seguito, aggiusto il pH a 5 utilizzando sodio idrossido 1M (20ml di sodio idrossido 20% su 100 di soluzione da utilizzare – circa 40ml).

Soluzione 100ml di acqua con TPP alla concentrazione di 7mg/ml (700mg), aggiustare il pH portandolo a 2.0 utilizzando acido cloridrico 1M (0.98ml su un totale di 100ml partendo da HCl 37% - circa 50ml).

Trasporto nel pallone la soluzione con il TPP e vado ad aggiungere l'acido ascorbico e Vitamina PP considerando una concentrazione 57mM quindi 1200mg e 834mg. Aggiungo poi il chitosano per la gelificazione.

È possibile rendere il metodo più efficiente andando ad eliminare la diluizione di sia sodio idrossido che acido cloridrico nella fase di aggiustamento del pH; in questo modo, l'aggiunta avverrà goccia a goccia e saranno sufficienti solamente 4mL di sodio idrossido e 1mL di acido cloridrico.

2.2.2. Caratterizzazione delle nanoparticles

2.2.2.1. Spettroscopia FT-IR

L'analisi è stata condotta tramite caricamento diretto di un'aliquota di campione sul supporto ATR dello strumento. La scansione è avvenuta da 3000 a 500 cm^{-1}

2.2.2.2. Titolazione via cromatografia HPLC

In questo caso specifico è stato adottato un classico metodo di separazione in fase inversa con pH tamponato con H_3PO_4 al valore di 3.00.

La colonna cromatografica è una C18 standard, 5 μm , 150x0.46. Il metodo prevede un flusso isocratico con una fase mobile composta da una miscela di H_2O e H_3PO_4 in rapporto 99.8/0.2. Il flusso è di 0.50 ml/min e la lunghezza d'onda impostata a 260 nm

La preparazione della retta di calibrazione è avvenuta avvalendosi una soluzione 0.01M di 100mL di acido ascorbico in $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{PO}_4$ 99.8/0.2. È stato accuratamente pesato l'acido ascorbico con l'utilizzo della bilancia analitica ed in seguito posto in un matraccio tarato di 100mL. La solubilizzazione è stata raffinata tramite bagno ad ultrasuoni per 10 min. Dalla soluzione madre sono stati prelevati 2mL e diluiti (1:10) in un matraccio da 20mL. Poi è stata fatta un'ulteriore diluizione (1:2) 5mL in un matraccio da 10mL. La retta di calibrazione si è dunque composta di tre punti.

Le emulsioni sono state analizzate pesando in un matraccio da 100ml 0,1g di emulsione, quindi portando a volume e sonicando per 10 minuti. La sospensione è stata quindi filtrata ed iniettata direttamente in colonna.

2.2.2.3 Test di cessione

In questo test si è voluta verificare la capacità dell'addotto di rilasciare l'acido ascorbico in soluzione acquosa. A tale scopo sono stati posti 0.1g di particelle in 3ml di acqua e la sospensione è stata analizzata ad intervalli regolari di 1h, 4h, 8h e 24h. L'analisi è avvenuta tramite HPLC con il metodo precedentemente descritto.

2.2.2.4 Velocità di sedimentazione

Per verificare la stabilità del sistema disperso, è stata utilizzata la centrifuga analitica multisample LUMiSizer® (L.U.M. GmbH, Berlino, Germania). Questa centrifuga è accoppiata con uno spettrometro NIR e impiega la tecnologia STEPTM (Space and Time-resolved Extinction Profiles). Il diverso comportamento dei singoli campioni può essere confrontato e analizzato in dettaglio tracciando la variazione di trasmissione in qualsiasi parte del campione o tracciando il movimento di qualsiasi limite di fase. [Figura 15]

Dal momento che le particelle sintetizzate vengono applicate in emulsione ed inglobate nella fase olio per preservarne l'ossidazione, si è deciso di verificare la velocità di sedimentazione in mezzi oleosi. In particolare, sono state scelte tre tipologie di olio:

- EthylhexylPalmitate, estere a medio peso molecolare;
- Caprylic/CapricTriglyceride, trigliceride a medio peso molecolare;
- Simmondsia chinensis seed oil, olio di jojoba (vegetale)

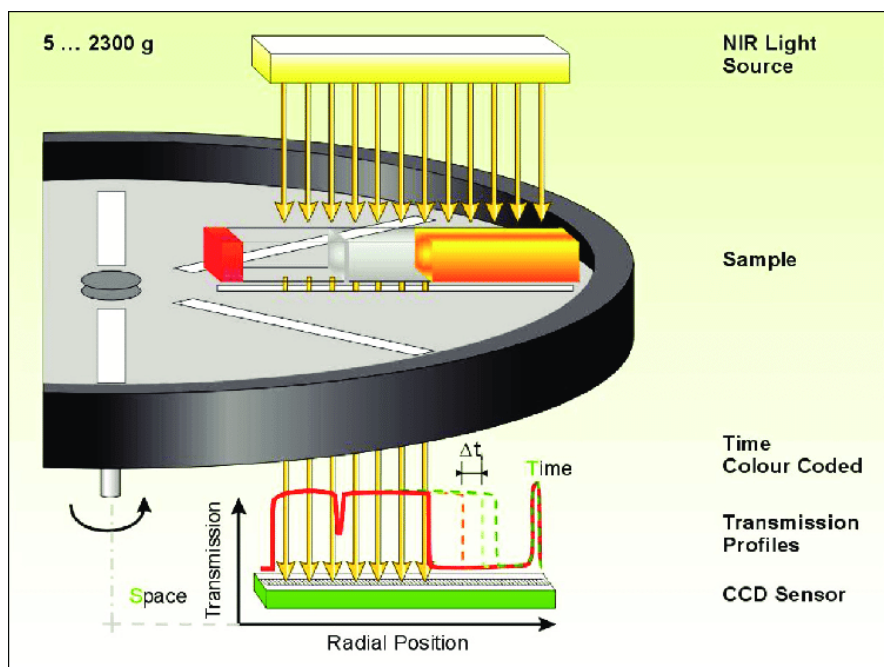


Figura 15. Schema di funzionamento della centrifuga analitica con spettrometro

Gli esperimenti sono stati condotti preparando i diversi campioni (tre replicati per ogni formulazione) nelle cuvette in polycarbonato ad una concentrazione di 10 mg/l. La misurazione è stata eseguita con una velocità di 2000 rpm a 470 nm di lunghezza d'onda del laser; 600 numeri di profilo sono stati rilevati ogni 10 secondi.

2.2.2.5 Potenziale Z (DSC/ELS)

Il diametro idrodinamico è stato misurato per mezzo di un Nicomp ZLS Z3000 multiangolo. Le polveri essiccate sono state nuovamente disperse in acqua ultrapura (10 mg/L) mediante sonicatore a sonda in un bagno di ghiaccio a 200 W per 10 minuti (in modalità pulsata all'80%). Tutte le misurazioni sono state prese dopo un pre-equilibrio di circa 5 minuti. La luce dispersa è stata raccolta con una fibra ottica impostata a un angolo di dispersione di 90° ($W = 25$ mW e $\lambda = 639$ nm) per almeno 6 minuti a temperatura ambiente.

La caratterizzazione del potenziale Zeta di Electrophoretic Light Scattering (ELS) è stata eseguita per mezzo di Nicomp ZLS Z3000 (PSS, Port Richey, FL, USA). I valori di potenziale zeta (Z-pot) di ciascun campione sono stati determinati nell'intervallo di pH 3–11 e utilizzando NaCl come elettrolita (10 mM), seguendo la procedura riportata da Brunelli e collaboratori.

L' elettroforesi è un processo elettrocinetico nel quale molecole e particelle cariche, in soluzione acquosa, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano in direzione del polo con carica opposta.

La velocità delle cellule e delle particelle dipende da:

- Intensità del campo elettrico;
- Costante dielettrica del mezzo;
- Viscosità del mezzo;
- Potenziale Zeta.

Le forze viscosive agiscono sulle particelle in direzione opposta al loro moto. Solo all'equilibrio le particelle si muoveranno con velocità costante.

È possibile calcolare il Potenziale Zeta dalla misura della velocità delle NPs sottoposte ad un campo elettrico noto, introducendo il concetto di "mobilità elettroforetica" U_E . Si tratta di una grandezza che esprime la tendenza di una particella a muoversi all'interno di un campo elettrico applicato ed è legata al Potenziale Zeta tramite l'equazione di Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

dove z [mV] rappresenta il Potenziale Zeta, ε [Fm⁻¹] la costante dielettrica dell'acqua, η [mPa · s] la viscosità del mezzo e $f(ka)$ la funzione di Henry. $f(ka)$ è rappresentata da una funzione dipendente dal valore assunto dalla lunghezza di Debye, che è la distanza spaziale oltre la quale gli ioni in soluzione schermano il campo elettrico, cioè la distanza per cui si ha la separazione di carica.

L'andamento della funzione di Henry rispetto al prodotto ka , dove a [m] rappresenta il raggio della particella e k^{-1} [m⁻¹] la lunghezza di Debye è sinusoidale.

$f(ka)$ può essere approssimata qualora ci si trovi in queste condizioni [Figura 16]:

- se la lunghezza di Debye è piccola rispetto al raggio della particella allora $f(ka)=1.5$ (approssimazione di Smoluchowski);

- se il raggio della particella è piccolo rispetto alla lunghezza di Debye allora $f(ka)=1.0$ (approssimazione di Huckel).

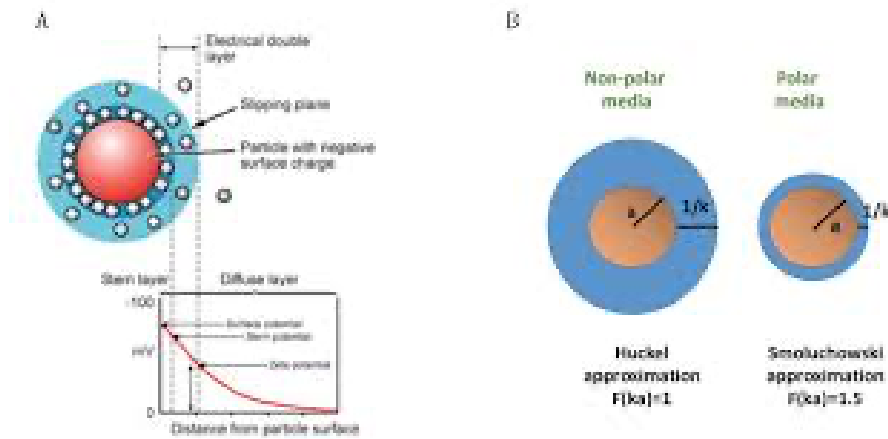


Figura 16. Approssimazioni possibili dell'Equazione di Henry

Dunque, per $ka < 1$ la funzione di Henry verrà approssimata mediante l'equazione:

$$f(ka) = 1 + \frac{(ka)^2}{16} - \frac{5(ka)^3}{48} - \frac{(ka)^4}{96} + \frac{(ka)^5}{96} - \left[\frac{(ka)^4}{8} - \frac{(ka)^6}{96} \right] e^{ka} \int \frac{e^{-t}}{t} dt$$

Mentre se $ka > 1$ con:

$$f(ka) = \frac{3}{12} - \frac{9}{2ka} + \frac{75}{2k^2a^2} - \frac{330}{k^3a^3}$$

Lo strumento usato per la misura della mobilità elettroforetica è il Laser Doppler Velocimetry (LDV) [Figura 27]. LDV è in grado di misurare la velocità delle particelle che si muovono in un fluido in un esperimento di elettroforesi. Esso, utilizzando una luce laser, valuta la lunghezza d'onda o la frequenza dei fotoni che colpiscono i corpuscoli in movimento.

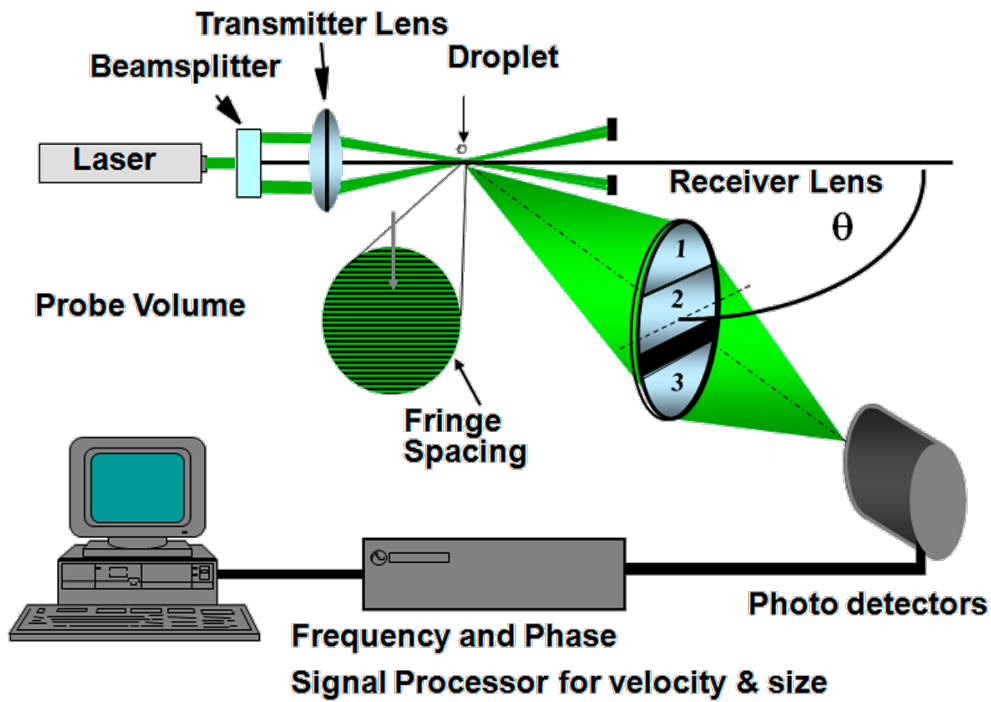


Figura 17. Schema di Funzionamento del Laser Doppler Velocimetry

La mobilità elettroforetica è misurata tramite uno shift di frequenza (Δv), [Figura 17] della luce diffusa dalle particelle attraverso la formula:

$$\Delta v = 2U_E \frac{\sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda}$$

dove θ è l'angolo di scattering e λ la lunghezza d'onda della luce incidente. Ciò produce un segnale di intensità, il cui tasso di fluttuazione è proporzionale alla velocità delle particelle.

2.2.2.6 Particle size

La grandezza delle particelle è stata misurata attraverso uno strumento a diffrazione laser (Mastersizer 3000).

L'analisi procede pesando una congrua quantità di analita che verrà analizzata in automatico dallo strumento stesso.

In una misurazione di diffrazione laser un raggio laser passa attraverso un campione di particolato disperso e viene misurata la variazione angolare dell'intensità della luce diffusa. Le particelle grandi diffondono la luce a piccoli angoli rispetto al raggio laser e le particelle piccole diffondono la luce a grandi angoli. I dati sull'intensità dello scattering angolare vengono quindi analizzati per calcolare la dimensione delle particelle che hanno creato il pattern di scattering utilizzando la teoria di Mie della dispersione della luce. La dimensione delle particelle è riportata come un diametro della sfera equivalente al volume. [Figura 18]

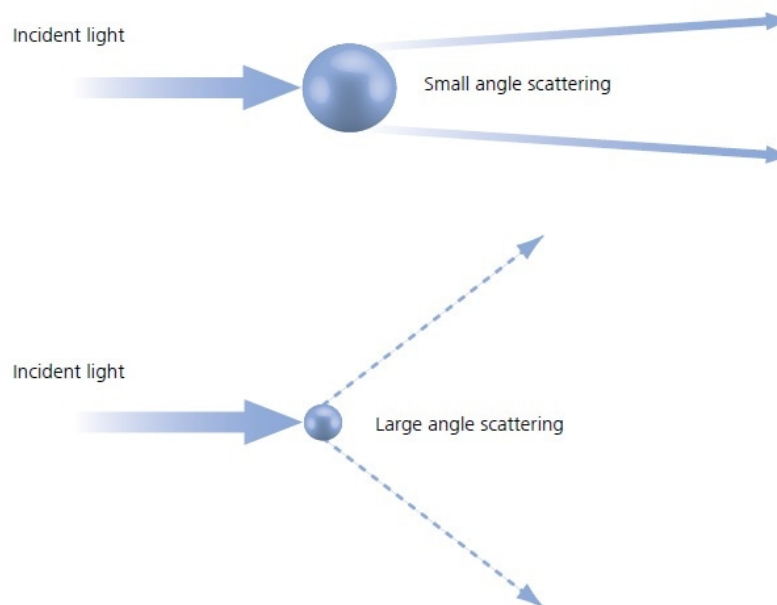


Figura 18. Schema generale della Teoria di Mie, sulla quale si basa il funzionamento degli strumenti Particle Size

2.2.2.7 *Analisi al microscopio*

L'analisi è stata eseguita al microscopio Leica DMIL Led con ingrandimento 4x e 10x e l'immagine acquisita con fotocamera integrata e software LAS X per sistema operativo Windows.

2.2.2.8 *Preparazione delle emulsioni*

Al fine di studiare l'applicabilità delle particelle in emulsione è stata preparata una formulazione base, la quale è stata funzionalizzata sia con le nanoparticelle, sia con le molecole pure. Queste emulsioni, poi, saranno stressate e titolate nuovamente per valutarne l'efficacia.

La formulazione dell'emulsione base è stata eseguita secondo quanto riportato. [Tabella 5]

Fase	Nome commerciale	INCI	Funzione	%
A	Olivem 1000	Ceteryl Olivatate, Sorbitan Olivatate	Emulsionante	3.00
	Cutina GMS	Glyceryl Stearate	Co-emulsionante	2.00
	Lanette OV	Cetearyl alcohol	Co-emulsionante, fattore di consistenza	1.00
	Cetiol C5	Coco-Caprylate	Emolliente	15.00
	Isocide BAS	Benzyl alcohol, Dehydroacetic Acid	Conservante	2.00
B	EDTA	EDTA	Chelante	0.30
	Glicerolo	Glycerin	Umettante	0.05
	Rhodicare T	Xanthan Gum	Modificatore reologico	1.00
C	Acqua	Aqua	Solvente	15.00
	AA/Ch-AA	Chitosan, Ascorbic Acid	Sost. Funzionale	3.00
D	Acqua	Aqua	Solvente	to 100

Tabella 5: formula quali quantitativa impiegata per i vari test di attività/stabilità

- I. In un becher preparare la fase A ad eccezione del conservante (Isocide BAS) e scaldare fino a completa fusione delle cere (80°C circa);
- II. Nel becher principale, preparare la fase acquosa (B+D) scaldando fino a 80-90°C;
- III. Sotto continua agitazione aggiungere gradualmente la fase ottenuta al punto I a quella ottenuta al punto II. Lasciare quindi in raffreddamento;
- IV. A parte preparare la fase C avendo cura di sospendere le nanoparticles tramite agitazione, onde evitare possibili rotture delle stesse;
- V. A 60°C aggiungere il conservante, quindi riemulsionare e lasciare nuovamente in raffreddamento;
- VI. A 50°C aggiungere la fase preparata in IV, quindi turbare a giri medio-bassi fino a completa dispersione.
- VII. Raffreddare a R.T.

2.2.2.9 *Analisi Chimico-Fisiche sul prodotto finito*

❖ *Misura del pH*

La misura del pH avviene per immersione diretta della sonda. Si tratta di un particolare elettrodo di pH combinato con sensore di temperatura NTC, con cavo fisso spina BNC+Cinch da 1m. Corpo in vetro. Dimensioni (LxØ) mm 35x6 con riempimento a polimero, esente da manutenzione. Punta da 6 mm apposta per immersione in corpi solidi e semi solidi.

❖ *Misura della densità*

Il parametro di densità è misurato tramite un densimetro automatico nel quale il campione è iniettato tramite siringa da 3 ml nella cella di misurazione. La lettura avviene a 25°C in seguito a retta di calibrazione su due punti (aria ed acqua distillata). Intervallo di misura da 0 a 3 g/cm³, accuratezza di 0.001 g/cm³, ripetibilità 0.0001 g/cm³, risoluzione 0.001 g/cm³, volume campione minimo di 1.20 ml.

❖ *Misura della viscosità*

Per la misura della viscosità (μ) delle emulsioni formulate è stato utilizzato un viscosimetro rotativo Brookfield con uno spindle SC4-29.

Lo strumento impiegato per la misurazione della resistenza del fluido allo scorrimento, questo il concetto espresso dalla viscosità, misura la forza necessaria per mantenere in rotazione un cilindro (girante), a velocità angolare costante, immerso nel campione in esame. Nello specifico, quando l'elemento rotante viene posto in movimento, a causa della viscosità del fluido, si genera una coppia di forze che esercita la propria pressione sul contenitore cilindrico. La coppia risultante dipende quindi da:

- velocità di rotazione w
- geometria della girante
- viscosità del campione

Dalla misura dell'intensità della coppia si può risalire con precisione alla viscosità del fluido.

L'unità di misura utilizzata per misurare la viscosità dinamica di un fluido è il centipoise (cPs): centesima parte del poise o millipascal al secondo (mPa·s). Viscosità dell'acqua a 21°C=1cPs (1mPa·s).

❖ *Centrifugazione*

Le emulsioni possiedono un'elevata instabilità intrinseca: la gravità, infatti, esercita sulle piccole gocce disperse una forza capace di determinarne l'unione e la successiva sedimentazione sul fondo o ascensione in superficie. A lungo andare questo processo, oltre ai fenomeni intermedi di flocculazione, coalescenza e sedimentazione, può portare alla separazione completa delle fasi (interna ed esterna) nei due componenti originali, con una conseguente perdita di efficacia del prodotto. Per questa ragione è fondamentale compiere dei test di stabilità accelerata servendosi della centrifuga da laboratorio. Questo strumento, attraverso l'uso dell'accelerazione centrifuga, simula la gravità esercitata sul composto nell'arco di un anno portando alla luce eventuali fenomeni di separazione e quindi sedimentazione tra corpi di diversa densità. Si tratta dell'applicazione del principio di Archimede e della legge di Stokes.

Sono stati prelevati 30g circa da ogni emulsione e inseriti all'interno di apposite provette Falcon™. Una volta poste nella centrifuga sono state centrifugate per 10 minuti a 6000 RPM e successivamente valutate visivamente.

2.2.2.10 Attività antiossidante in vitro. Metodo DPPH

DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) è un test per la verifica dell'attività scavenger creato da Blois nel 1958 (42) [Figura 19].

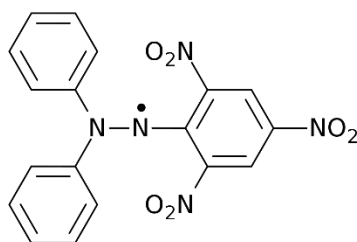


Figura 19. Molecola di DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

Il DPPH è un radicale azotato organico stabile di colore viola con un'assorbanza massima di 515nm (43). Come riportato nella tabella riassuntiva vari tipi di saggi per la valutazione delle proprietà antiossidanti (Tab.1), il DPPH test può essere considerato come un saggio basato sia sul trasferimento di un idrogeno (HAT) che di un elettrone (SET). Si può però dire che il DPPH test sia considerato essere basato principalmente sul metodo SET e che il metodo HAT risulti essere solo marginale (43) poiché avviene solo in solventi in grado di instaurare legami forti come l'etanolo e il metanolo (44). [Figura 20]

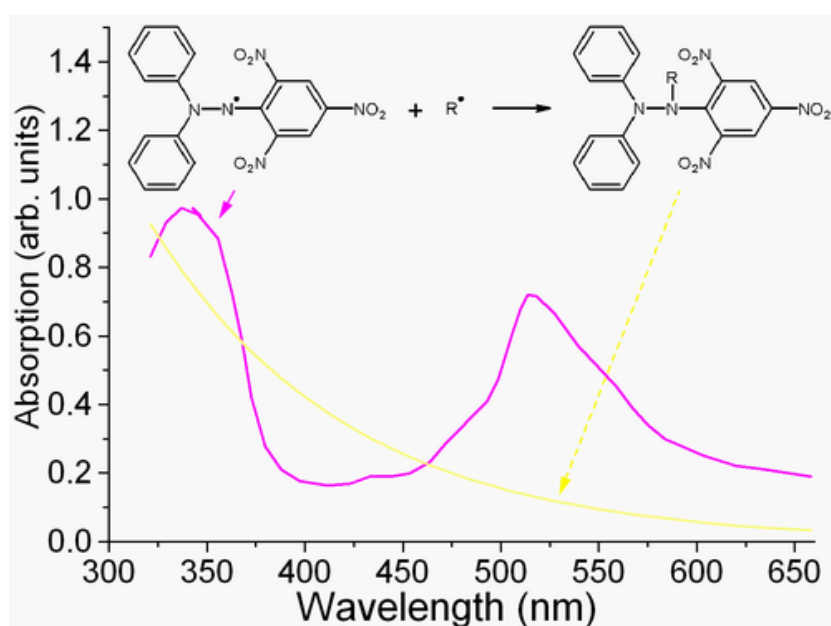


Figura 20. Schema di reazione DPPH. Rielaborato (Liang & Kitts, 2014).

Considerando la disponibilità di saggi per la valutazione delle proprietà antiossidanti, il DPPH è un test semplice, rapido e poco costoso, effettuato tramite l'uso di uno spettrofotometro UV/Vis, che può valutare l'attività antiossidante di composti non enzimatici (42).

Il DPPH presenta però lo svantaggio che la sua reazione con l'antiossidante dipende fortemente dalla possibilità che tali molecole hanno di accedere al suo sito radicalico: da ciò ne consegue che molecole con meno ingombro sterico accedono meglio all'elettrone spaiato. Il saggio DPPH si può effettuare sia in soluzioni alcoliche che idroalcoliche di metanolo o etanolo, per questo può essere utilizzato per l'analisi di composti antiossidanti idrofili e lipofili (43).

In presenza di una molecola antiossidante quindi, il DPPH vira il suo colore da viola a giallo e la sua capacità di assorbimento scompare (45). Si può più precisamente dire che l'intensità della colorazione viola del DPPH è inversamente proporzionale all'attività antiossidante del composto preso in esame (46). Il risultato del test potrebbe essere valutato considerando l'IC50 (o EC50), cioè la quantità di antiossidante necessaria per ridurre la metà della concentrazione del DPPH di partenza ma in alcuni casi risulta essere più immediato andare a considerare l'esponenziale della curva di decadimento monitorata nel tempo. Si può quindi affermare che la variazione del DPPH osservata tramite spettroscopia UV/Vis rappresenta un buon punto di partenza per la valutazione delle capacità scavenger di una molecola per poi poterla usare in un secondo momento come attivo antiossidante.

Il metodo DPPH è stato opportunamente adattato alla determinazione in vitro dell'attività antiossidante sia della materia prima tal quale, sia dell'emulsione. Questo prevede la pesata accurata di 1g di emulsione in un matraccio da 50ml, quindi diluizione con acqua deionizzata e sonicazione per 10 minuti a R.T. La soluzione così ottenuta viene filtrata e 0.5 ml prelevati ed analizzata in cuvetta con 2.5 ml di soluzione 61 μ M di DPPH. Nel caso della materia prima tal quale le quantità non variano, l'unica differenza consta nella sostituzione dell'emulsione con una soluzione contenente la medesima concentrazione di AA o Ch-AA.

2.2.2.11 Tecniche di invecchiamento accelerato

Ogni prodotto cosmetico subisce normalmente, in seguito all'invecchiamento o all'utilizzo, variazioni più o meno marcate che il formulatore è tenuto a verificare mediante test di stabilità. Questi, noti anche come test di shelf life, vengono eseguiti su cosmetici e prodotti medicali per verificare gli standard di qualità fisici, chimici e microbiologici nel corso della conservazione. I metodi di analisi della Farmacopea Europea si riferiscono a colorazione, odore, aspetto, pH, viscosità, carico microbico ed efficacia antimicrobica. Lo scopo finale è quello di valutare la sicurezza del prodotto assicurando al consumatore standard di qualità elevati e determinare al contempo la durata di conservazione. (47)

I test di stabilità, studiati per evitare il deterioramento della struttura chimico-fisica del prodotto e per permetterne l'idoneità per aspetti microbiologici, possono essere eseguiti monitorando la formulazione alle normali condizioni di conservazione (test di stabilità semplice) o modificandole (test di stabilità accelerata). I protocolli di invecchiamento accelerato, così definiti i test in cui viene aumentata la temperatura di conservazione, sono finalizzati

all'ottenimento delle informazioni necessarie riducendo il tempo di prova. I test di stabilità, generalmente, vengono eseguiti in due fasi: prove di stabilità isoterma a lungo termine (UST) e prove di stabilità accelerata o prove di stress (HST).

Sono state valutate tre diverse condizioni di stoccaggio con un tempo di analisi pari a 30 giorni:

- temperatura ambiente ed esposizione alla luce (photostability)
- conservazione in stufa ad una temperatura costante di 45°C
- conservazione in frigo termostato caratterizzato da rampe 4°C/40°C

Le diverse preparazioni sono state valutate qualitativamente a distanza di 1, 2 e 3 mesi prestando attenzione ad aspetto visivo, olfattivo e stendibilità.

2.3. Risultati e Discussione

2.3.1. Caratterizzazione delle nanoparticles

2.3.1.1. Spettroscopia FT-IR

Gli spettri FT-IR di miscele Ch (Chitosano), AA (Acido Ascorbico), Ch-AA Mix (Miscela Chitosano ed Acido Ascorbico) ed il complesso Ch-AA (Chitosano funzionalizzato con Acido Ascorbico). [Figura 22]

In figura 22D si nota un caratteristico picco di intensità medio-forte a $3417,5\text{ cm}^{-1}$ attribuibile agli stretching sovrapposti dei gruppi $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$, è inoltre osservabile il picco (C=O) dell'ammide primaria a $1643,7\text{ cm}^{-1}$. Gli stretching dei C-H alifatici della catena polimerica è verificabile a $2923,6\text{ cm}^{-1}$. La debole vibrazione di deformazione del legame C-CH₃ appare a $1383,8\text{ cm}^{-1}$, indicando l'effettiva deacetilazione del chitosano impiegato in questi esperimenti [Figura 21].

I quattro picchi in fig. 22A da 3524 cm^{-1} a 3214 cm^{-1} sono ascrivibili ai quattro gruppi $-\text{OH}$ rispettivamente a C6, C3, C5, C2. La vibrazione di stretching del C=O del lattone che forma un legame H intramolecolare si osserva tramite la presenza della vibrazione a $1754,4\text{ cm}^{-1}$ mentre quella del C=O lattonico coinvolto in un legame H intermolecolare è verificata a $1673,8\text{ cm}^{-1}$.

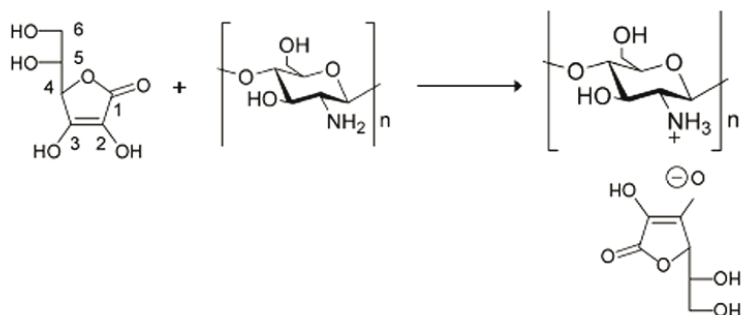


Figura 21. Meccanismo di addizione proposto dell'acido ascorbico al chitosano

Le figure 22C e 22D mostrano spettri FT-IR abbastanza diversi l'uno dall'altro, dimostrando l'effettiva formazione di complessi tra Ch e AA. Il picco a $1754,4\text{ cm}^{-1}$, che rappresentava lo stretching di stiramento del C=O lattonico che coinvolto nel legame H intramolecolare in AA, subisce uno shifting a $1650,8\text{ cm}^{-1}$ ad intensità ridotta. Si può vedere che la nuova banda di assorbimento caratteristica del bending di $-\text{NH}_3^+$ appare a $1616,1\text{ cm}^{-1}$.

Questo risultato suggerisce che i gruppi $-NH_2$ sulle catene CH siano protonati dall' H^+ fornito dall'acido ascorbico. La diminuzione del picco a $3428,2\text{ cm}^{-1}$ in fig. 22D indica la riduzione dei gruppi liberi $-NH_2$ dopo la formazione del complesso Ch-AA [Figura 22].

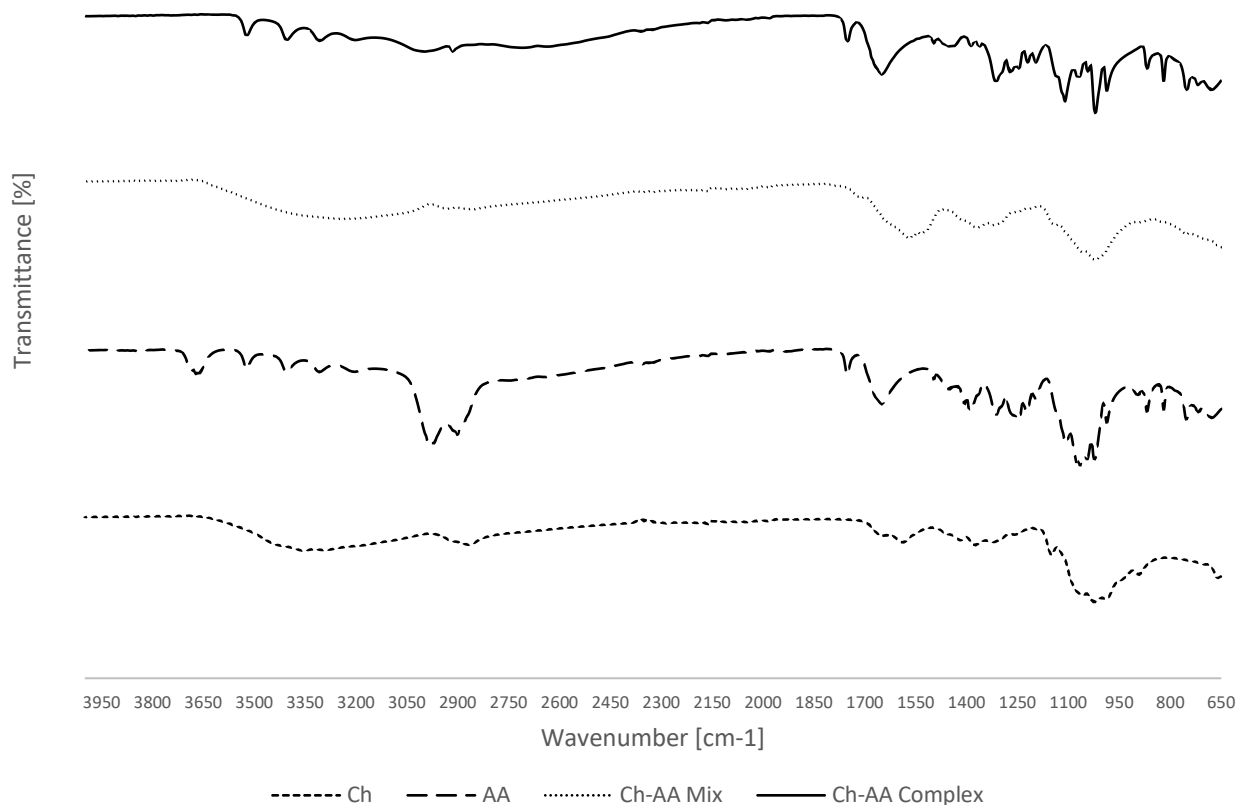


Figura 22. Spettroscopia FT-IR relativa a: A Acido Ascorbico (AA), B: Chitosano (Ch), C: miscela di Chitosano ed Acido Ascorbico (Ch-AA Mix), D: nanoparticelle di Chitosano con Acido Ascorbico (Ch-AA Complex)

La caratterizzazione è stata eseguita anche per l'addotto contenente Vitamina PP. Purtroppo, dall'analisi spettrale, la funzionalizzazione è risultata piuttosto scarsa, con un segnale piuttosto scarso del gruppo piridinico e ammidico. Probabilmente il doppietto elettronico dell'azoto amidico inibisce la reattività della vitamina PP non consentendo un'iterazione efficace con il chitosano e, pertanto, reticolando una minima quantità di questa molecola. Anche l'analisi all'HPLC del surnatante confermerà lo scarso incapsulamento della Vitamina PP. Per tale ragione si è deciso di concentrarci esclusivamente sull'addotto Ch-AA.

2.3.1.2. Titolazione via cromatografia HPLC

Innanzitutto, è stata determinata la retta di calibrazione secondo il metodo descritto nella sezione precedente. I punti analizzati sono a 10, 25 e 50 ppm e sono rappresentati in figura sottostante [Figura 23]:

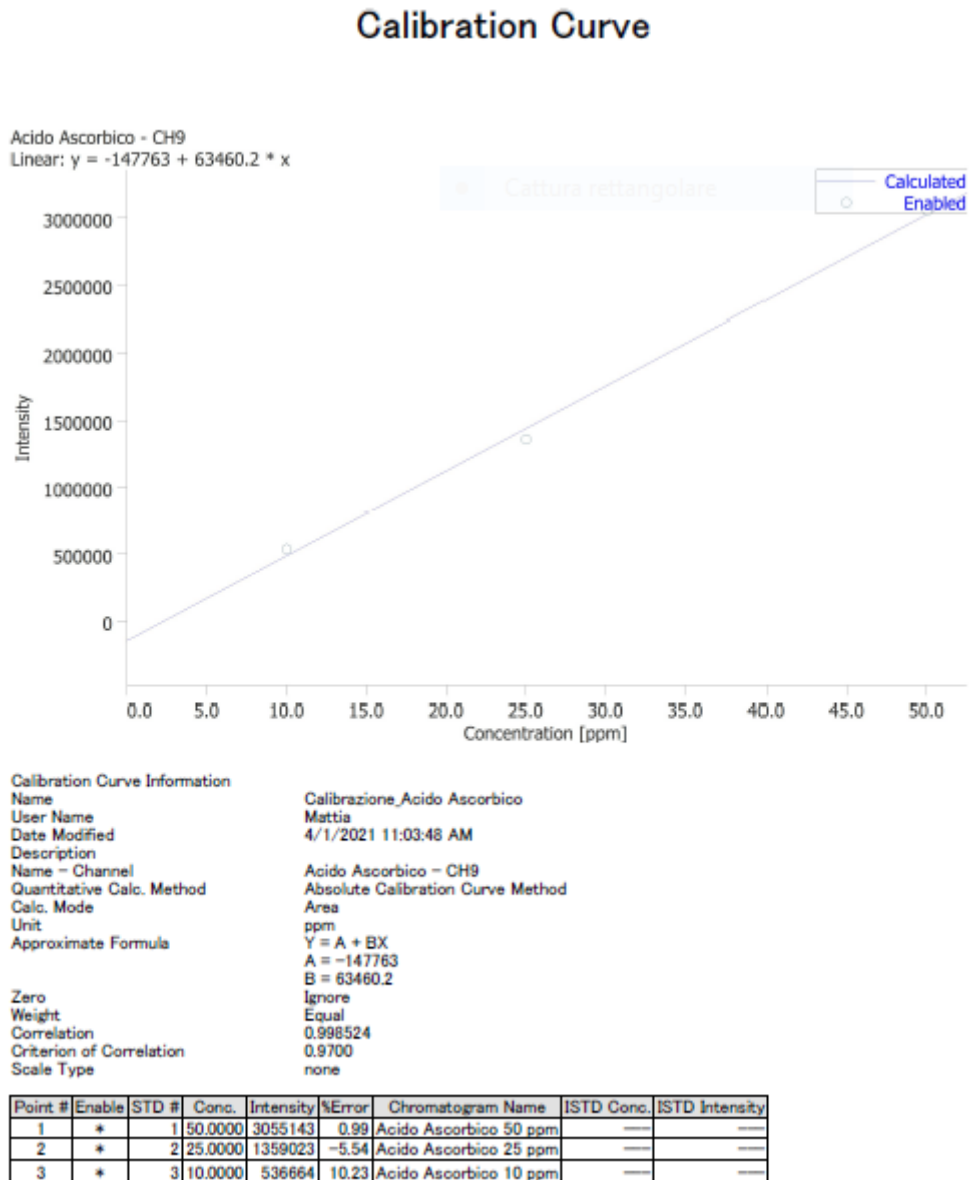


Figura 23. Retta di taratura considerata per la determinazione dell'acido ascorbico all'HPLC

da cui è stato ottenuto il seguente cromatogramma rappresentativo di un test su un'emulsione analizzata pesando in un matraccio da 100ml 0,1g di analita, quindi portando a volume e sonicando per 10 minuti. La sospensione è stata quindi filtrata con filtro 0.45 μ M ed iniettata direttamente in colonna. [Figura 24]

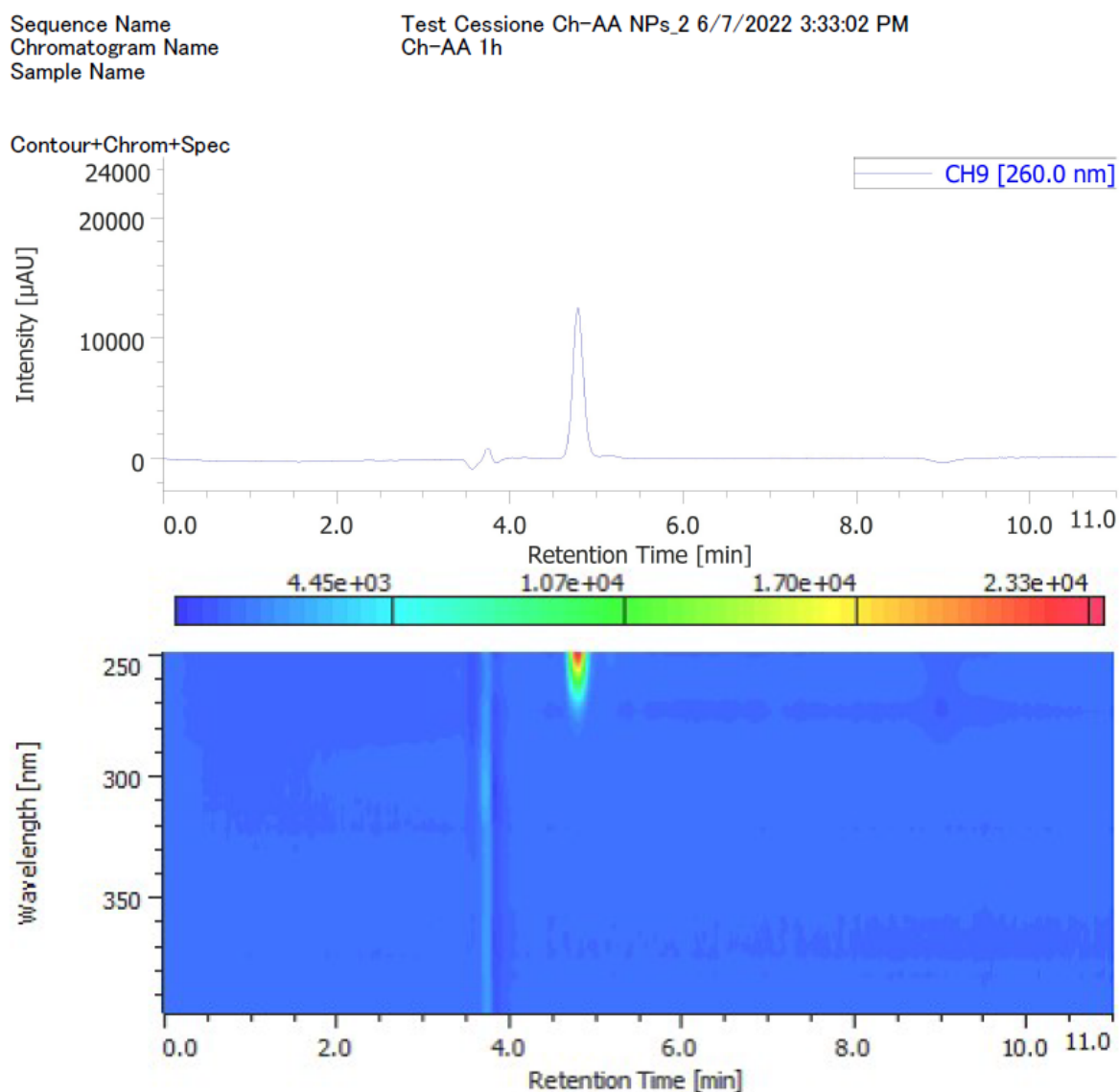


Figura 24. Cromatogramma relativo alla vitamina C. L'eluizione è attorno ai 5 minuti con un picco ben definito.

Tramite analisi HPLC si è riusciti a valutare quantitativamente il grado di funzionalizzazione delle particelle di chitosano (EE%, Entrapment Efficiency %). Ci si è avvalsi del semplice calcolo sotto riportato:

$$EE\% = \frac{\text{Quantità totale di AA} - \text{Quantità di AA incapsulato}}{\text{Quantità totale di AA}} \cdot 100$$

Il valore totale di AA è stato determinato via HPLC ricreando la soluzione acquosa di AA con i medesimi volumi finali della miscela di reazione. Nonostante tale metodo sia più incline ad errori umani dovuti alle pesate ed alla simulazione dell'ambiente di reazione originale, esso consente tuttavia di liberare il campo dall'errore concettuale derivante dal presupporre una completa cessione della vitamina C in acqua durante i test di cessione.

I dati sono stati ottenuti sulla media di tre analisi. Il valore di funzionalizzazione è del $25.7 \pm 6.5\%$.

2.3.1.3. Test di cessione

Con questo test si è desiderato valutare l'andamento della cessione di acido ascorbico da parte delle particelle. Anche in questo caso i valori sono stati valutati tramite analisi HPLC, le quali hanno permesso di valutare un trend. Il test è stato condotto in triplicato nell'arco delle 24h ed i risultati sono sotto riportati: [Tabella 6]

Tempo (h)	Acido Ascorbico	Dev. St.
1	3.466	0.222
4	3.617	0.322
8	4.020	0.258
16	4.072	0.200
24	4.106	0.145

Tabella 6: valori espressi in ppm relativi alla cessione di acido ascorbico

I dati ottenuti sono stati riportati nel grafico sottostante, dal quale è apprezzabile una tendenza che perdura nell'arco delle 24h. [Figura 25]

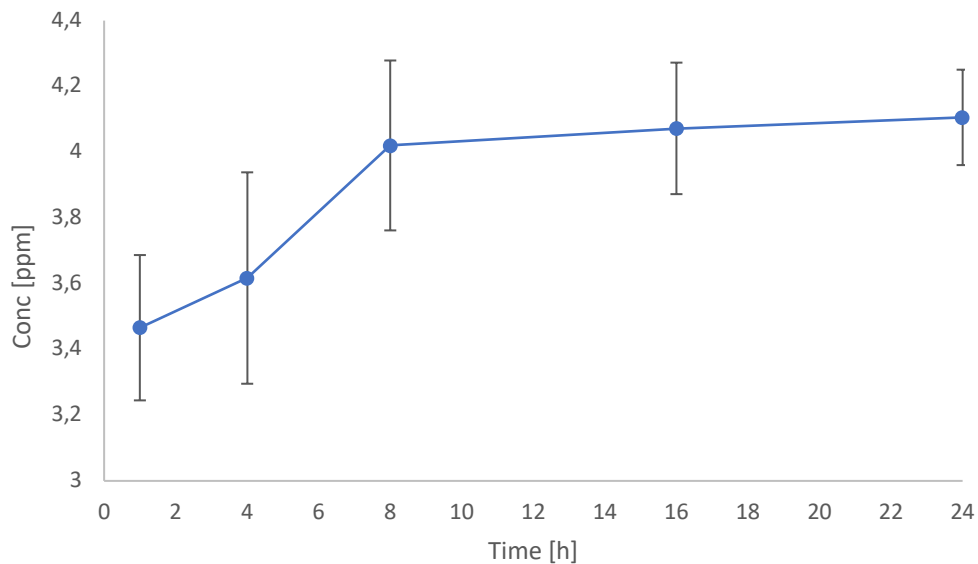


Figura 25. Andamento della cessione di acido ascorbico nel tempo

2.3.1.4. Velocità di sedimentazione

La scelta di una matrice oleosa, a discapito di una acquosa è stata apportata in un secondo momento, in quanto le precedenti analisi misuravano una velocità di sedimentazione troppo elevata per la misurazione.

Le analisi in ambiente oleoso sono state condotte in triplicato sia sul materiale polimerizzato senza attivo (acido ascorbico o Vitamina PP), sia sul materiale polimerizzato con acido ascorbico come singolo attivo.

I risultati ottenuti sono descritti nel grafico sottostante: [Figura 26]

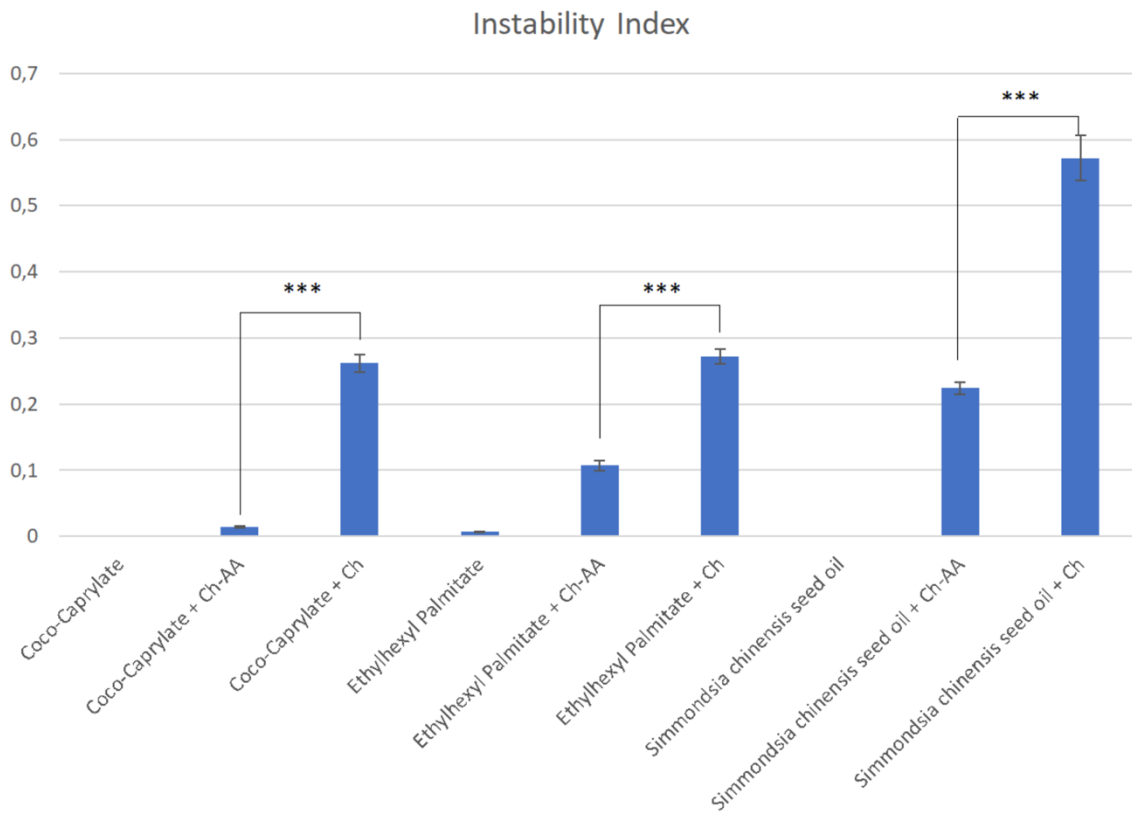


Figura 26. Andamento dell'instabilità negli olii considerati

È indispensabile sottolineare come all'inizio dell'analisi sia stata osservata una precipitazione delle particelle in tutti i mezzi disperdenti trattati, di conseguenza i risultati ottenuti sono relativi solo alla frazione più prossima alla scala nanometrica. Eseguita questa doverosa precisazione possono comunque essere colti alcuni interessanti andamenti. Innanzitutto, la funzionalizzazione sembra avere un effetto positivo nei riguardi della stabilità delle particelle più piccole con una evidente stabilizzazione delle stesse. Al fine di stabilire quale possa essere la dipendenza tra stabilità e natura del mezzo disperdente, i dati sono stati organizzati confrontando l'indice di stabilità con i valori di Spread e Log P. [Tabella 7]

	Instability Index	Dev. Std	Spread (mm²/10min)	Log P
Coco-Caprylate	0.001	0.000	1200	8.72
Coco-Caprylate + Ch- AA	0.014	0.001	1200	8.72
Coco-Caprylate + Ch	0.262	0.008	1200	8.72
Ethylhexyl Palmitate	0.007	0.001	900	10.61
Ethylhexyl Palmitate + Ch-AA	0.107	0.009	900	10.61
Ethylhexyl Palmitate + Ch	0.272	0.019	900	10.61
Simmondsia chinensis Seed Oil	0.001	0.000	700	20.29
Simmondsia chinensis seed Oil + Ch-AA	0.224	0.020	700	20.29
Simmondsia chinensis seed oil + Ch	0.572	0.006	700	20.29

Tabella 7. Valori di instabilità in dipendenza tra Spread e Log P

Dalla tabella sovrastante si sono potuti elaborare i seguenti grafici: [Figure 27 e 28]

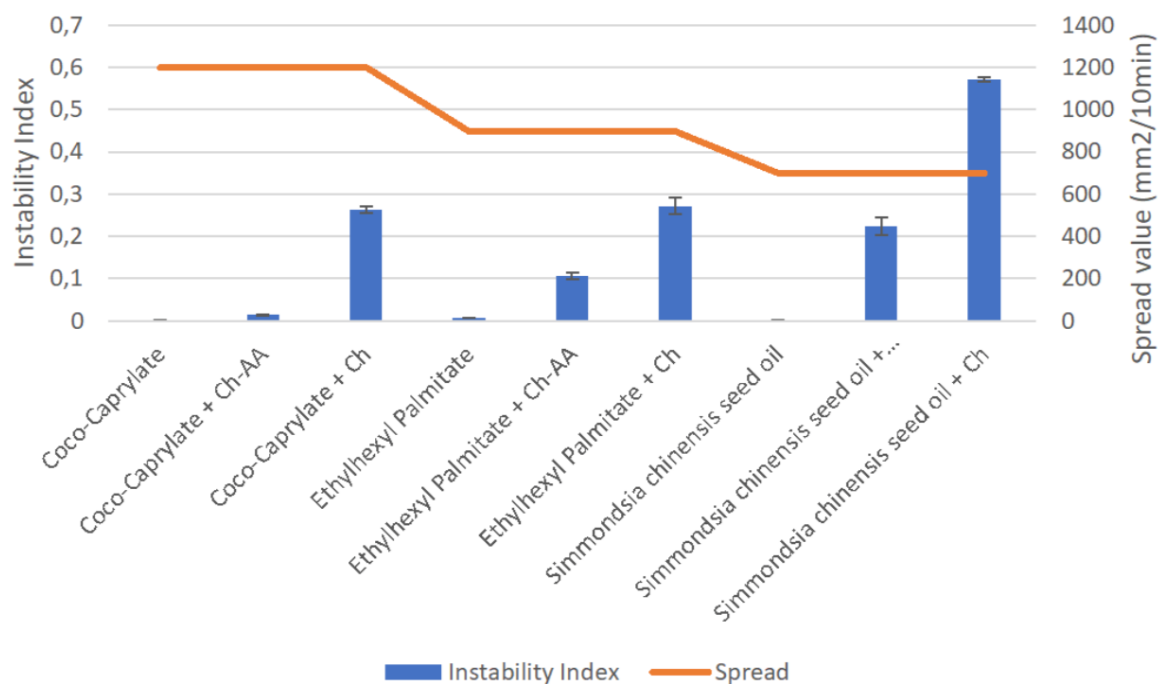


Figura 27. Andamento dell'instabilità nei confronti dello Spread

Il comportamento segue un andamento inversamente proporzionale

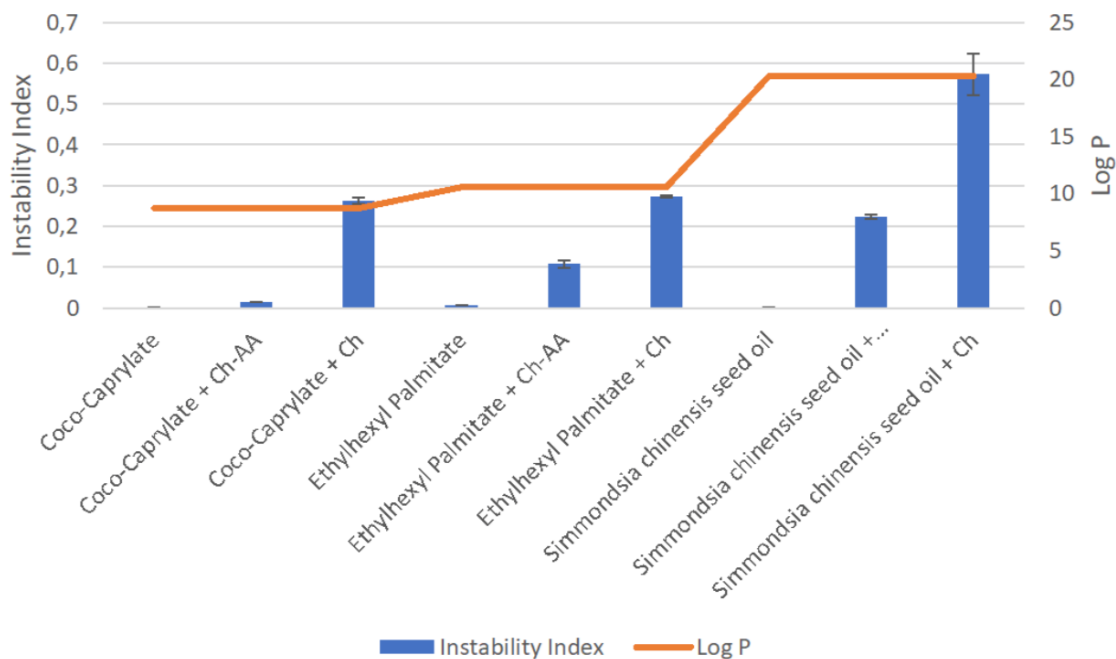


Figura 28. Andamento dell'instabilità nei confronti del Log P.

Il comportamento segue un andamento direttamente proporzionale.

Dai valori ottenuti si nota una sostanziale dipendenza proporzionale rispetto al Log P, e quindi alla polarità dell'olio. Questo è spiegabile considerando una probabile aumento della polarità in seguito a funzionalizzazione. Tale fattore sembrerebbe essere maggiormente importante rispetto ad un aumento dello spread dello stesso olio.

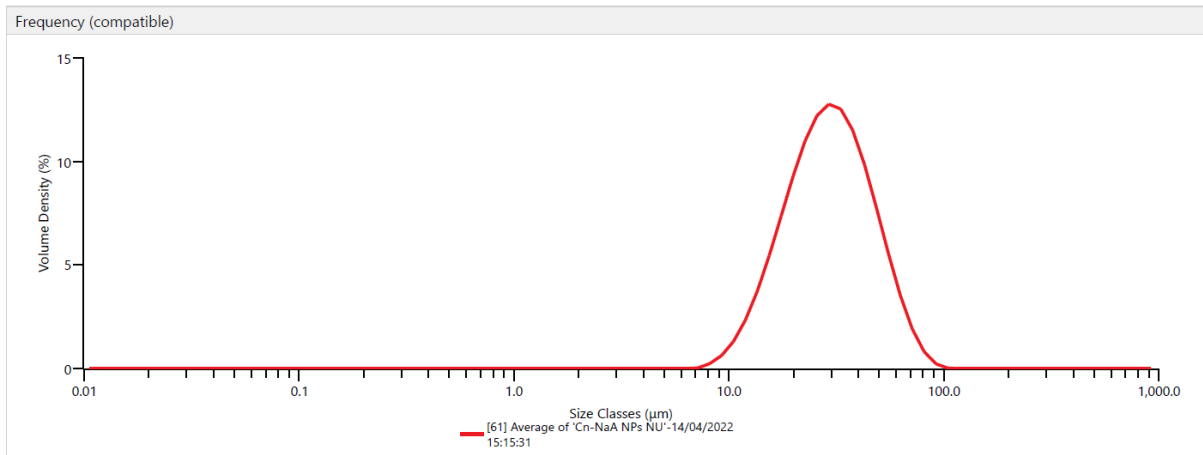
2.3.1.5. Potenziale Z (DSC/ELS)

In maniera analoga a quanto sopra descritto, anche la misura del potenziale Z è stata rilevata in tre mezzi oleosi diversi. Purtroppo, tale analisi non è andata a buon fine, né in mezzo acquoso, né in mezzo oleoso, questo a causa della forte instabilità del sistema disperso dovuto alla scala micrometrica del particolato.

2.3.1.6. Particle Size

Questa tecnica ha permesso la determinazione del diametro medio delle particelle di chitosano sintetizzate. Nonostante la scarsa funzionalizzazione con Vitamina PP sono state eseguite comunque le analisi anche dell'addotto Ch-AA-VPP. I risultati sono sotto riportati: [Figure 29 e 30]

Analysis	Result
Particle Name Oleic Acid	Concentration 0,0134 %
Particle Refractive Index 1,458	Span 1,228
Particle Absorption Index 0,010	Uniformity 0,379
Dispersant Name Water	Specific Surface Area 229,9 m ² /kg
Dispersant Refractive Index 1,330	D [3;2] 26,1 μm
Scattering Model Mie	D [4;3] 31,9 μm
Analysis Model General Purpose	Dv (10) 15,8 μm
Weighted Residual 0,45 %	Dv (50) 29,2 μm
Laser Obscuration 4,02 %	Dv (90) 51,7 μm



Result													
Size (μm)	% Volume In	Size (μm)	% Volume In	Size (μm)	% Volume In	Size (μm)	% Volume In	Size (μm)	% Volume In	Size (μm)	% Volume In	Size (μm)	% Volume In
0,0100	0,00	0,0597	0,00	0,357	0,00	2,13	0,00	12,7	3,09	76,0	0,64	454	0,00
0,0114	0,00	0,0679	0,00	0,405	0,00	2,42	0,00	14,5	4,53	86,4	0,16	516	0,00
0,0129	0,00	0,0771	0,00	0,460	0,00	2,75	0,00	16,4	6,14	98,1	0,00	586	0,00
0,0147	0,00	0,0876	0,00	0,523	0,00	3,12	0,00	18,7	7,75	111	0,00	666	0,00
0,0167	0,00	0,0995	0,00	0,594	0,00	3,55	0,00	21,2	9,18	127	0,00	756	0,00
0,0189	0,00	0,113	0,00	0,675	0,00	4,03	0,00	24,1	10,22	144	0,00	859	0,00
0,0215	0,00	0,128	0,00	0,767	0,00	4,58	0,00	27,4	10,69	163	0,00	976	0,00
0,0244	0,00	0,146	0,00	0,872	0,00	5,21	0,00	31,1	10,50	186	0,00	1110	0,00
0,0278	0,00	0,166	0,00	0,991	0,00	5,92	0,00	35,3	9,64	211	0,00	1260	0,00
0,0315	0,00	0,188	0,00	1,13	0,00	6,72	0,01	40,1	8,23	240	0,00	1430	0,00
0,0358	0,00	0,214	0,00	1,28	0,00	7,64	0,18	45,6	6,47	272	0,00	1630	0,00
0,0407	0,00	0,243	0,00	1,45	0,00	8,68	0,50	51,8	4,61	310	0,00	1850	0,00
0,0463	0,00	0,276	0,00	1,65	0,00	9,86	1,06	58,9	2,91	352	0,00	2100	0,00
0,0526	0,00	0,314	0,00	1,88	0,00	11,2	1,92	66,9	1,56	400	0,00	2390	0,00

Figura 29. Risultati di Particle Size per le particelle Ch-AA

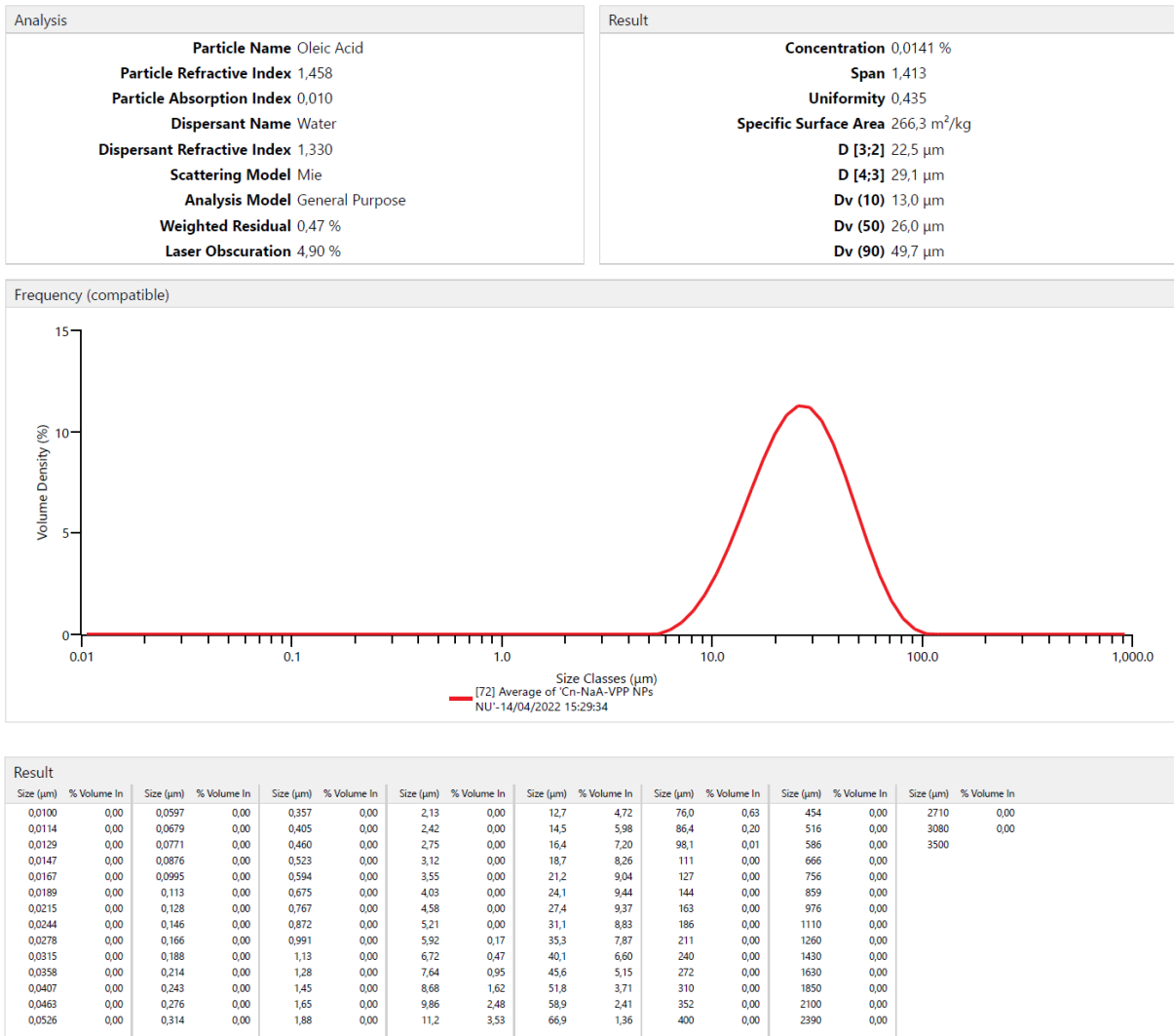
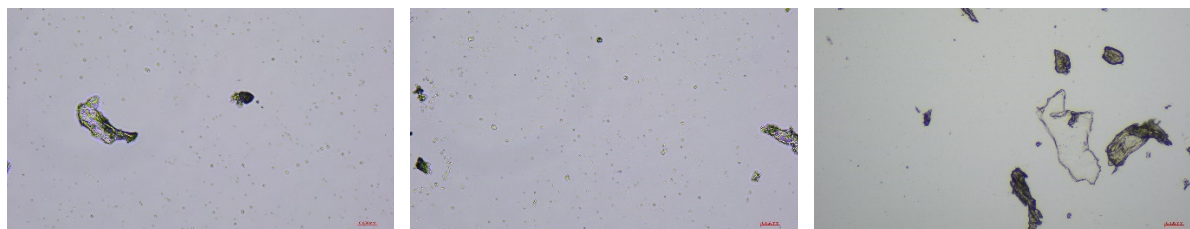


Figura 30. Risultati di Particle Size per le particelle Ch-AA-VPP

2.3.1.7. Analisi al microscopio ottico

Inseguito ad analisi del particle size e verificato che la scala è spostata verso il micrometrico, si è deciso di eseguire un'analisi al microscopio ottico che ha fornito i seguenti risultati utilizzando ingrandimenti 4x e 10x (le analisi sono state condotte sia con contrasto che senza): [Figure 31 e 32]

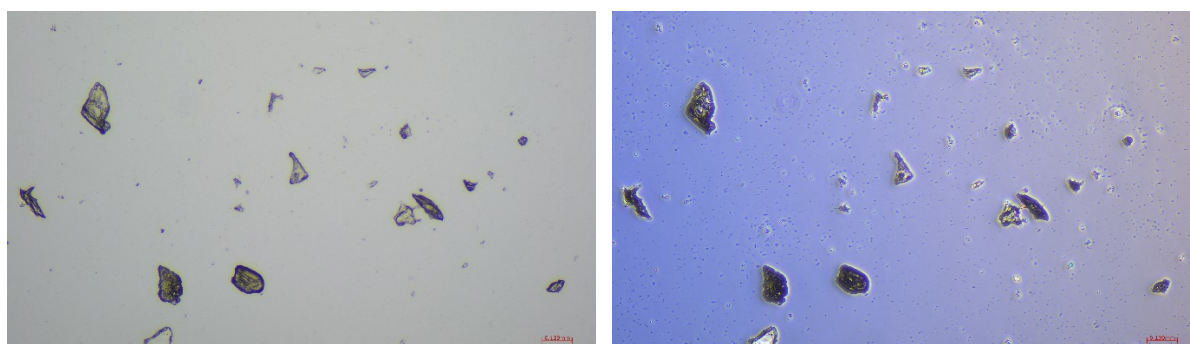
❖ *Chitosano polimerizzato non funzionalizzato*



a.

b.

c.



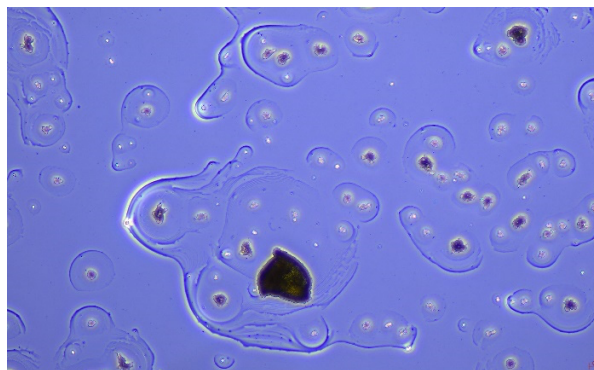
d.

e.

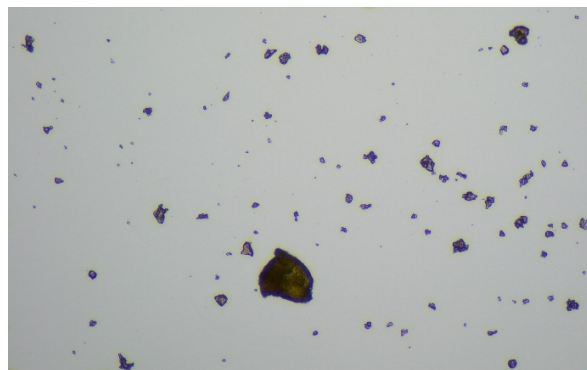
Figura 31. Analisi al microscopio ottico del chitosano polimerizzato non funzionalizzato

In tutte le analisi compaiono chiari i cristalli di chitosano polimerizzati con acido tripolifosforico. La scala è confermata essere micrometrica e non macrometrica.

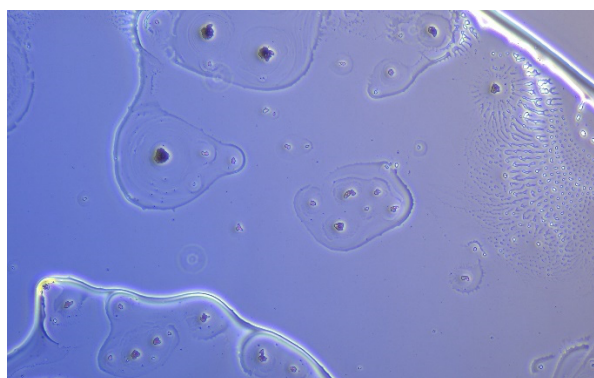
❖ *Chitosano polimerizzato funzionalizzato*



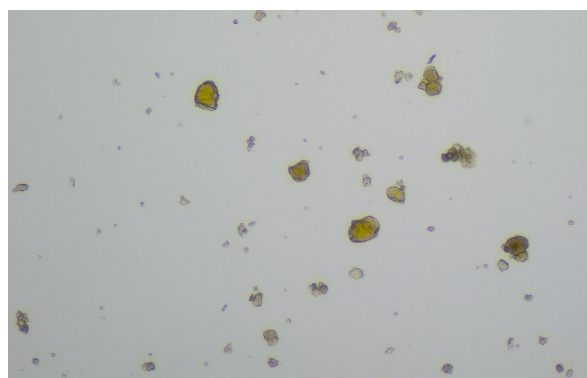
a.



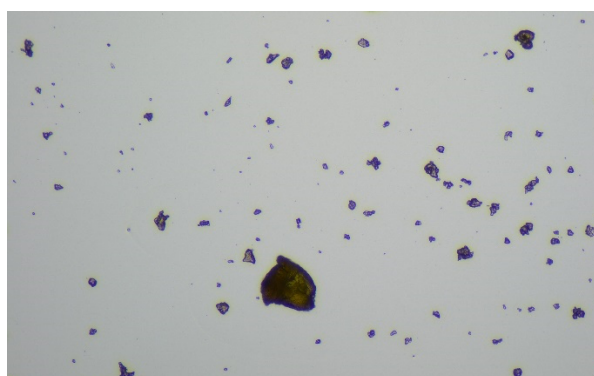
b.



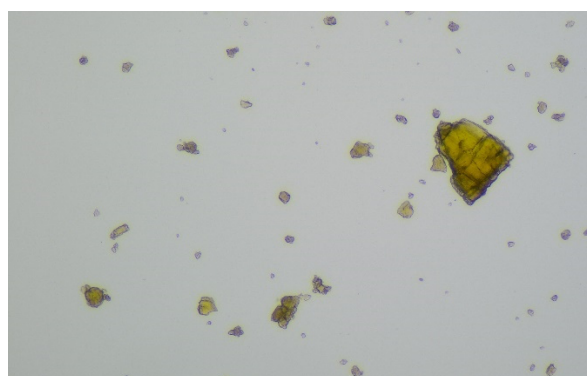
c.



d.



e



f

Figura 32. Analisi al microscopio ottico del chitosano polimerizzato funzionalizzato

È evidente il cambiamento di colore e della scala micrometrica degli stessi

2.3.1.8. Attività antiossidante in vitro

Il potere antiossidante in vitro è stato valutato rispettivamente sia sulla materia prima tal quale, sia sulla emulsione all'interno della quale sono stati aggiunti AA e Ch-AA. Nel caso dell'emulsione sono stati considerati due intervalli di tempo nei quali il campione è stato stoccato in stufa a 45°C per due mesi. Questo ha permesso di determinare se effettivamente la funzionalizzazione del chitosano riuscisse a garantire o meno una protezione dell'acido ascorbico. I risultati sono stati espressi in termini di concentrazione di DPPH ancora attivo rimanente in soluzione in seguito all'aggiunta di miscela antiossidante. Di seguito un esempio dello spettro del DPPH in seguito ad aggiunta di miscela antiossidante. I risultati sono stati letti in seguito ad agitazione della cuvetta per 1 minuto successivamente all'aggiunta di miscela antiossidante. [Figura 33]

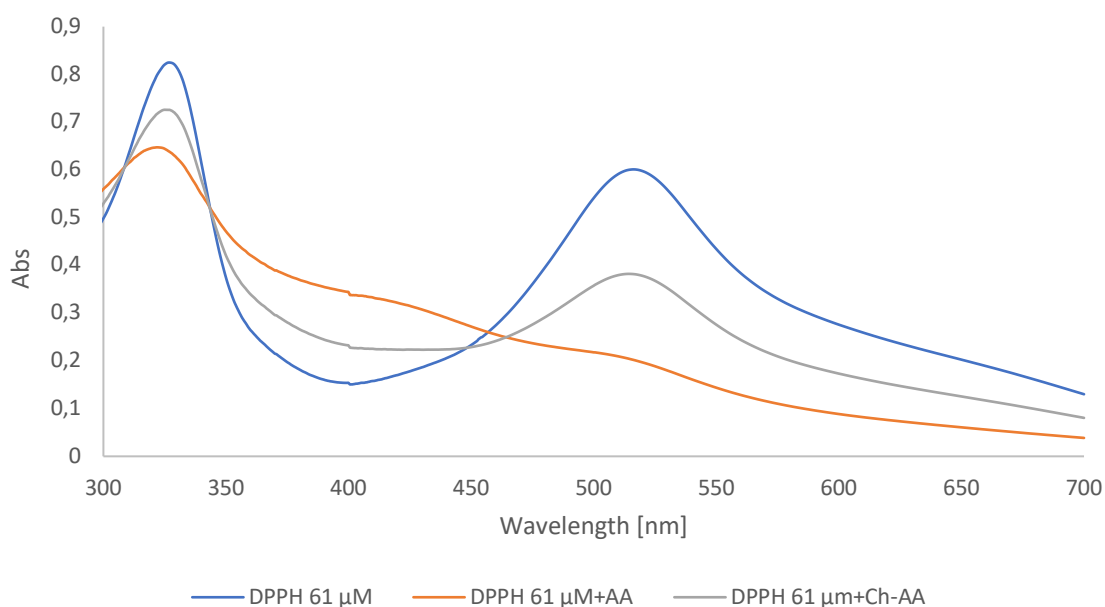


Figura 33. Assorbanze relative alla miscela di DPPH in seguito ad aggiunta di miscela antiossidante. Si nota la diminuzione del picco a 517nm, riferimento per i vari paragoni

I dati ottenuti sono organizzati nella tabella [7] sottostante:

	DPPH 100%	Soluzione		Emulsione t₀		Emulsione t₁ (2 mesi)	
	DPPH 61 μM	DPPH 61 μM+AA	DPPH 61 μm+Ch- AA	DPPH 61 μM+AA	DPPH 61 μm+Ch- AA	DPPH 61 μM+AA	DPPH 61 μm+Ch- AA
	100	33.456	63.483	41.966	71.000	101.927	93.600
%	-	26.465	53.324	35.675	63.357	90.621	84.953
	-	40.003	61.754	47.045	78.515	100.260	86.668
Media	100	33.308	59.521	41.562	70.957	97.603	88.407
Dev.St	-	6.77	5.44	5.70	7.58	6.10	4.58

Tabella 8. Andamento delle assorbanze alle varie condizioni di stoccaggio e di analita

È interessante notare come sia per le sostanze pure che per l'emulsione a t₀ si abbia un maggior potere antiossidante del solo acido ascorbico. Tale effetto può essere dovuto da due fattori: innanzitutto alla minor presenza di acido ascorbico nelle microparticelle se confrontati con il medesimo peso di acido ascorbico puro, in secondo luogo la reticolazione della stessa vitamina C potrebbe renderla meno disponibile per un'azione di scavenger nei confronti del radicale idrazilico.

Nonostante le criticità derivanti evidenziate, al termine dei due mesi di invecchiamento accelerato con esposizione all'ossigeno, si nota un'attività significativamente migliore dell'addotto di chitosano nei confronti dell'acido ascorbico puro. Tali evidenze sono osservabili in figura sottostante. [Figura 34]

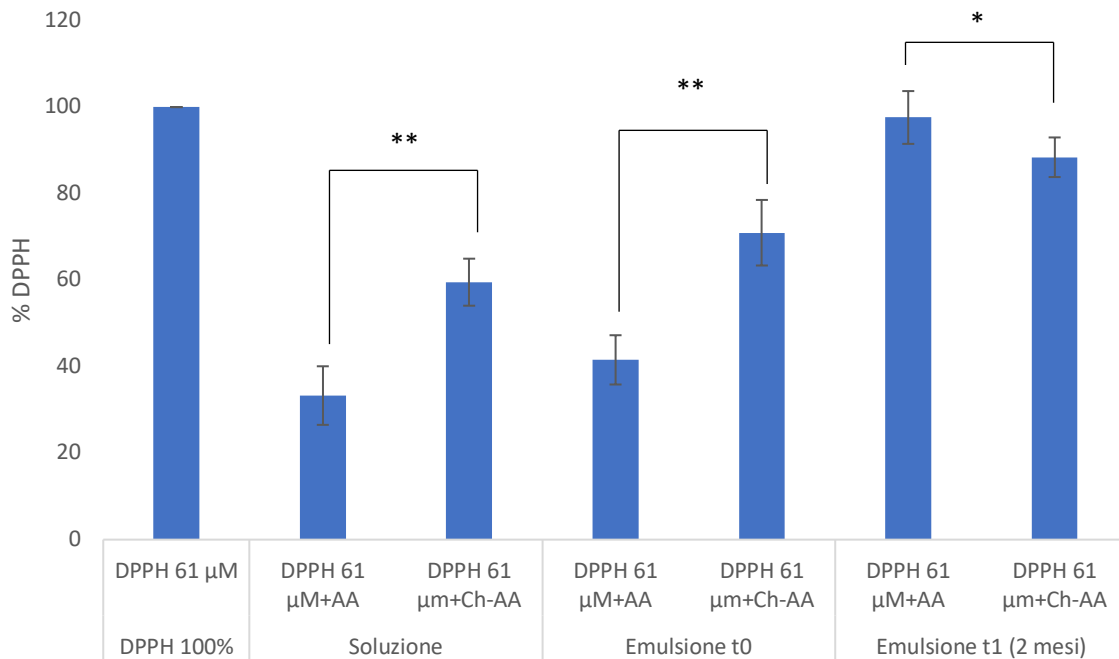


Figura 34. *Variazione dell'attività antiossidante tra emulsioni e soluzione. Per le prime è presentata una variazione anche in termini temporali allo scadere del secondo mese*

2.3.1.9. *Analisi Chimico-Fisiche sulle emulsioni*

Alle emulsioni prodotte sono state eseguite le analisi chimico fisiche caratteristiche per ogni prodotto cosmetico:

- Determinazione della viscosità con viscosimetro rotazionale;
- Determinazione del pH;
- Stabilità in centrifuga, tramite valutazione visiva in seguito a centrifugazione a 6000 rpm per 10 minuti;

Densità

Generalmente l'industria cosmetica aggiunge a questi tre parametri la valutazione della densità. Questo dato risulta fondamentale in fase di confezionamento del prodotto per poter convertire i chili prodotti in millilitri per ciascun contenitore. Dal momento che il lavoro svolto si basa sulla valutazione sperimentale delle proprietà di prototipi, non destinati alla produzione, tale

parametro risulta di scarsa importanza. Si è comunque valutata la densità iniziale (Tabella 9), senza però indagarne l'evoluzione in fase di studio. [Tabella 9]

Campione	Densità (g/ml)
Emulsione con AA	0.978±0.02
Emulsione con Ch-AA	0.981±0.02

Tabella 9. Valori di Densità a t0

Viscosità

Tale parametro è stato valutato nel tempo ad intervalli di 15 giorni. I valori sono stati monitorati sia in seguito a stoccaggio a 45°C, sia dopo stoccaggio a R.T. [Tabella 10]

Condizione	Campione	t ₀	15 giorni	30 giorni	45 giorni	60 giorni
45°C	Emulsione con AA	36250±100 cPs	34020±100 cPs	32054±100 cPs	28550±100 cPs	26080±100 cPs
	Emulsione con Ch-AA	37080±100 cPs	35100±100 cPs	34560±100 cPs	30010±100 cPs	29060±100 cPs
R.T.	Emulsione con AA	36250±100 cPs	37058±100 cPs	37800±100 cPs	37550±100 cPs	37998±100 cPs
	Emulsione con Ch-AA	37080±100 cPs	37500±100 cPs	38020±100 cPs	37740±100 cPs	37780±100 cPs

Tabella 10. andamento della viscosità in seguito a stoccaggio a 45°C e R.T.

pH

Anche il valore di pH è stato monitorato nel tempo ad intervalli di 15 giorni. In entrambe i casi il pH è stato mantenuto tra il 4.50 e 5.50 per stabilizzare la vitamina C. [Tabella 11]

Condizione	Campione	t ₀	15 giorni	30 giorni	45 giorni	60 giorni
45°C	Emulsione con AA	4.45	4.28	4.19	4.22	4.20
	Emulsione con Ch-AA	4.56	4.55	4.40	4.45	4.28
R.T.	Emulsione con AA	4.45	4.48	4.43	4.40	4.38
	Emulsione con Ch-AA	4.56	4.49	4.47	4.51	4.55

Tabella 11. Andamento dei valori di pH nel tempo.

I valori iniziali sono stati volutamente mantenuti bassi per garantire una maggiore preservazione della vitamina C

Centrifugazione

Le analisi sono procedute a 6000 rpm per 10 minuti complessivi. È stata sempre pesata una quantità di prodotto pari a 15±2 g in provette Falcon da 50ml. [Tabella 12]

Condizione	Campione	t ₀	15 giorni	30 giorni	45 giorni	60 giorni
45°C	Emulsione con AA	Stabile	Stabile	Stabile	Stabile	Stabile
	Emulsione con Ch-AA	Stabile	Stabile	Stabile	Stabile	Stabile
R.T.	Emulsione con AA	Stabile	Stabile	Stabile	Stabile	Stabile
	Emulsione con Ch-AA	Stabile	Stabile	Stabile	Stabile	Stabile

Tabella 12. Condizioni delle emulsioni in seguito a centrifugazione.

3. CONCLUSIONI

Durante la pandemia, il mercato della cosmetica, soprattutto l'asse legato al trattamento personale, ha subito una buona crescita potenzialmente grazie al fatto che donne e uomini hanno trovato e riscoperto il tempo e il piacere di prendersi cura di sé e della propria pelle. Secondo i dati di Cosmetica Italia (rapporto annuale dei consumi cosmetici nel 2021 54° edizione) il mercato interno di prodotti cosmetici nel 2021 ha registrato un aumento del +8,8% rispetto all'anno precedente e si stima un aumento di un ulteriore 4% nel 2022, con un valore di fatturato che supererà i 12 miliardi di euro.

La ricerca di molecole funzionali e formulazioni innovative, supportate da studi in grado di dimostrarne stabilità ed efficacia, sono fondamentali per lo sviluppo e la riuscita commerciale di nuovi prodotti cosmetici. Con questo lavoro, svolto all'interno di una azienda cosmetica fortemente orientata all'innovazione e alla ricerca, ho potuto studiare e percorrere i vari step necessari per lo sviluppo e la successiva realizzazione di un prodotto finito, con il valore aggiunto di crescita personale ed esperienza nell'ambito della dermocosmesi.

Durante questo lavoro di tesi nei laboratori dell'azienda, nel corso del tempo, ho sperimentato ed affinato un metodo efficace per la sintesi di particelle di chitosano funzionalizzate con acido ascorbico. Ho verificato pertanto la loro sintesi e funzionalizzazione servendomi di tecniche analitiche spettroscopiche e di cromatografia liquida, mentre l'analisi particellare è stata condotta valutando la velocità di sedimentazione, il potenziale Z ed il particle size tramite LDV.

Ho confermato la funzionalizzazione eseguendo una spettroscopia IR per entrambi gli attivi funzionali. Al fine di dare ulteriore validità alla formazione dell'addotto ho eseguito un'analisi tramite titolazione. Nello specifico, la cromatografia liquida mi ha permesso di valutarne la quantità e la cessione nel tempo. L'attività antiossidante dei nuovi addotti è stata vagliata in vitro tramite test di scavenging utilizzando il radicale DPPH, comunemente usato per questa tipologia di test. Un'attività antiossidante è stata effettivamente dimostrata, anche se questa potrebbe essere sensibilmente sottostimata a causa degli ingombri sterici derivanti dal reticolo polimerico che ingloba l'acido ascorbico.

Ho proceduto eseguendo un'analisi particellare degli addotti ottenuti, grazie alla stretta collaborazione con i laboratori del dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università Ca'Foscari, con l'obiettivo di determinare sia il diametro medio che la loro stabilità in soluzione. Un primo tentativo di valutazione della stabilità su mezzo acquoso è fallito a causa del diametro medio troppo elevato e della conseguente precipitazione. È pertanto stato impossibile determinare il potenziale Z nonostante i numerosi tentativi di riduzione meccanica delle particelle. Il cambio di mezzo (oleoso anziché acquoso) ha permesso di estrapolare dei valori indicativi di stabilità delle particelle. I risultati ottenuti hanno evidenziato una maggiore sospensione delle particelle funzionalizzate e soprattutto una dipendenza diretta con la polarità dell'olio.

Dalle analisi particellari eseguite al microscopio ottico, ne è derivata una scala micrometrica dell'addotto e non nanometrica. Questo fattore può essere interpretato come positivo dal punto di vista della commercializzazione, notoriamente intimorita da materiali nanometrici. Dal punto di vista dell'attività funzionale, invece, potrebbe essere ridotta la biodisponibilità degli attivi.

In seguito alla caratterizzazione delle particelle ho provveduto alla formulazione e all'applicazione in emulsione base dell'addotto ottenuto. Le dimensioni micrometriche delle particelle non hanno interferito con la sensorialità del prodotto finito, portandolo ad avere una texture più asciutta.

Ho testato i prodotti finiti in diverse condizioni di stabilità accelerata (45°C, shock termico 4-45°C e R.T.) ai quali in seguito ho eseguito delle analisi chimico-fisiche ad intervalli regolari. Il risultato è un sostanziale mantenimento delle proprietà organolettiche ma anche un deciso miglioramento nella conservazione delle molecole di acido ascorbico con una netta riduzione del viraggio di colore. Infine, i test di cessione hanno dimostrato un interessante rilascio nel tempo dell'attivo funzionalizzante.

Grazie a questa sperimentazione e ai risultati finora ottenuti, l'azienda ha intenzione di sviluppare alcuni prodotti cosmetici contenenti tali microparticelle di chitosano ed acido ascorbico al fine di valutarne ulteriormente gli effetti dermatologici.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Martini, Simmons, Tallitsch. Anatomia Umana. In: EdiSES, editor. 2017.
2. Tozzoli R. Il tessuto adiposo come organo endocrino: ruolo della diagnostica di laboratorio nell'obesità e nella sindrome metabolica. 2010;6.
3. Zhang L, Pornpattananangkul D, Hu CMJ, Huang CM. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Curr Med Chem*. 2010 Jan 18;17(6):585–94.
4. Desgouilles S, Vauthier C, Bazile D, Vacus J, Grossiord JL, Veillard M, et al. The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study. *Langmuir* [Internet]. 2003 Oct 28 [cited 2022 Aug 22];19(22):9504–10. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la034999q>
5. Zielinska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Nagasamy Venkatesh D, et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* 2020, Vol 25, Page 3731 [Internet]. 2020 Aug 15 [cited 2022 Aug 22];25(16):3731. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/16/3731/htm>
6. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E, Fessi H. Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. *Pharmaceutical Research* 1998 15:7 [Internet]. 1998 [cited 2022 Aug 22];15(7):1056–62. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1011934328471>
7. Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int J Pharm* [Internet]. 2017 Oct 30 [cited 2022 Aug 22];532(1):66–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28801107/>
8. Chiellini F. Perspectives on: In Vitro Evaluation of Biomedical Polymers: <http://dx.doi.org/10.1177/0883911506064672> [Internet]. 2016 Jul 26 [cited 2022 Aug 22];21(3):257–71. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0883911506064672>
9. Heller J. Polymers for controlled parenteral delivery of peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 1993 May 1;10(2–3):163–204.
10. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Jan 31;62(1):3–11.

11. Younes I, Rinaudo M, Harding D, Sashiwa H. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs* 2015, Vol 13, Pages 1133-1174 [Internet]. 2015 Mar 2 [cited 2022 Aug 22];13(3):1133–74. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/13/3/1133/htm>
12. Frigaard J, Jensen JL, Galtung HK, Hiorth M. The Potential of Chitosan in Nanomedicine: An Overview of the Cytotoxicity of Chitosan Based Nanoparticles. *Front Pharmacol* [Internet]. 2022 May 4 [cited 2022 Aug 22];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35600854/>
13. Liu D, Wei Y, Yao P, Jiang L. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. *Carbohydr Res.* 2006 May 1;341(6):782–5.
14. de Lima Batista AC, de Souza Paiva W, de Souza Neto FE. Chitosan. *Polysaccharides of Microbial Origin* [Internet]. 2022 [cited 2022 Aug 23];229–46. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-42215-8_14
15. Pantaleone D, Yalpani M, Scollar M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. *Carbohydr Res.* 1992 Dec 31;237(C):325–32.
16. Yeh HY, Lin JC. Surface characterization and in vitro platelet compatibility study of surface sulfonated chitosan membrane with amino group protection-deprotection strategy. *J Biomater Sci Polym Ed* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2022 Aug 23];19(3):291–310. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18325232/>
17. Farizano J v., Díaz Vergara LI, Masias E, Baillo AA, Torino MI, Fadda S, et al. Biotechnological use of dairy by-products for the production and microencapsulation of the food preservative enterocin CRL35. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2022 [cited 2022 Aug 23];369(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35325116/>
18. Sahariah P, Másson M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules* [Internet]. 2017 Nov 13 [cited 2022 Aug 23];18(11):3846–68. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.biomac.7b01058>
19. Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem.* 2009 Jun 15;114(4):1173–82.
20. Geisberger G, Gyenge EB, Hinger D, Käch A, Maake C, Patzke GR. Chitosan-thioglycolic acid as a versatile antimicrobial agent. *Biomacromolecules* [Internet]. 2013 Apr 8 [cited 2022 Aug 23];14(4):1010–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23470196/>
21. Kaya M, Cakmak YS, Baran T, Asan-Ozusaglam M, Menten A, Tozak KO. New chitin, chitosan, and O-carboxymethyl chitosan sources from resting eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea);

- with physicochemical characterization, and antimicrobial and antioxidant activities. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2014 19:1 [Internet]. 2014 Mar 11 [cited 2022 Aug 23];19(1):58–69. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-013-0488-9>
22. Azuma K, Izumi R, Osaki T, Ifuku S, Morimoto M, Saimoto H, et al. Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New Materials. *J Funct Biomater* [Internet]. 2015 Mar 13 [cited 2022 Aug 23];6(1):104. Available from: </pmc/articles/PMC4384104/>
 23. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004 Jan 1;57(1):35–52.
 24. Chandy T, Rao GHR, Wilson RF, Das GS. Delivery of LMW Heparin via Surface Coated Chitosan/peg-Alginate Microspheres Prevents Thrombosis. <http://dx.doi.org/101080/10426500290095584> [Internet]. 2008 [cited 2022 Aug 23];9(2):87–96. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10426500290095584>
 25. Utami W, Anggani H, Purbiati M. Cytotoxicity effect of orthodontic miniscrew-implant in different types of mouthwash: An in-vitro study. *J Orthod Sci*. 2022 Jan 1;11(1):5.
 26. Abhinaya M, Parthiban R, Kumar PS, Vo DVN. A review on cleaner strategies for extraction of chitosan and its application in toxic pollutant removal. *Environ Res*. 2021 May 1;196:110996.
 27. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology, Concise* - Herman F. Mark - Google Libri [Internet]. [cited 2022 Aug 23]. Available from: [https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=Vfh1AQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=2.+Mar k,+Herman+Francis,+et+al.+%22Encyclopedia+of+polymer+science+and+engineering.&ots=5 FaN_KYjxZ&sig=rJB__9qHeB4_vdP09UgKHFjYcN8#v=onepage&q&f=false](https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=Vfh1AQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=2.+Mark,+Herman+Francis,+et+al.+%22Encyclopedia+of+polymer+science+and+engineering.&ots=5FaN_KYjxZ&sig=rJB__9qHeB4_vdP09UgKHFjYcN8#v=onepage&q&f=false)
 28. Valdés F. [Vitamin C]. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2006 [cited 2022 Aug 23];97(9):557–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17173758/>
 29. Wang K, Jiang H, Li W, Qiang M, Dong T, Li H. Role of Vitamin C in Skin Diseases. *Front Physiol* [Internet]. 2018 Jul 4 [cited 2022 Aug 23];9(JUL). Available from: </pmc/articles/PMC6040229/>
 30. Yin X, Chen K, Cheng H, Chen X, Feng S, Song Y, et al. Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology. *Antioxidants* 2022, Vol 11, Page 153 [Internet]. 2022 Jan 13 [cited 2022 Aug 23];11(1):153. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/1/153/htm>

31. Jang K il, Hyeon GL. Stability of Chitosan Nanoparticles for l-Ascorbic Acid during Heat Treatment in Aqueous Solution. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2008 Mar 26 [cited 2022 Aug 23];56(6):1936–41. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf073385e>
32. Makarov M v., Trammell SAJ, Migaud ME. The chemistry of the vitamin B3 metabolome. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2019 [cited 2022 Aug 23];47(1):131–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30559273/>
33. Chen AC, Damian DL. Nicotinamide and the skin. *Australasian Journal of Dermatology* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2022 Aug 23];55(3):169–75. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ajd.12163>
34. Gille A, Bodor ET, Ahmed K, Offermanns S. Nicotinic Acid: Pharmacological Effects and Mechanisms of Action. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006094746> [Internet]. 2008 Jan 9 [cited 2022 Aug 23];48:79–106. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094746>
35. di Stefano G, Manerba M, Vettrai M. NAD Metabolism and Functions: A Common Therapeutic Target for Neoplastic, Metabolic and Neurodegenerative Diseases.
36. Forbat E, Al-Niaimi F, Ali FR. Use of nicotinamide in dermatology. *Clin Exp Dermatol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2022 Aug 23];42(2):137–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ced.13021>
37. Kawada A, Konishi N, Oiso N, Kawara S, Date A. Evaluation of anti-wrinkle effects of a novel cosmetic containing niacinamide. *J Dermatol* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2022 Aug 23];35(10):637–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1346-8138.2008.00537.x>
38. LEGGE 11 ottobre 1986, n. 713. Norme per l'attuazione delle direttive della Comunità' economica europea sulla produzione e la vendita dei cosmetici.
39. REGOLAMENTO (CE) n. 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO. 2009 Nov 30;
40. Ministero della Salute. decisione 2006/257/CE . 2006 Apr 5;
41. REGOLAMENTO (UE) 2017/745 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO. 2017 Apr 5;
42. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature*. 1958;181(4617):1199–200.

43. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2005 Mar 23 [cited 2022 Oct 18];53(6):1841–56. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf030723c>
44. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2008 Apr 14 [cited 2022 Oct 18];613(1):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18374697/>
45. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995 Jan 1;28(1):25–30.
46. Sirivibulkovit K, Nouanthavong S, Sameenoi Y. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Anal Sci* [Internet]. 2018 [cited 2022 Oct 18];34(7):795–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29998961/>
47. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare [Internet]. [cited 2022 Oct 18].