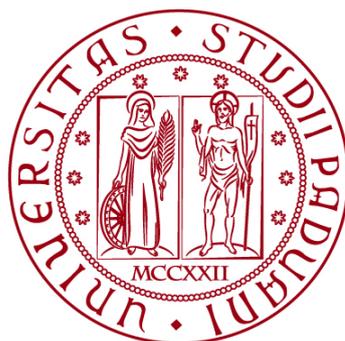


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**STUDI DI STABILITÀ DI FORMULAZIONI
COSMETICHE: VALUTAZIONE E
VALIDAZIONE DELL'EFFICACIA
PREDITTIVA**

**Relatore: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare**

**Correlatore: Dott.ssa Afra Moretti
Unifarco S.p.A.**

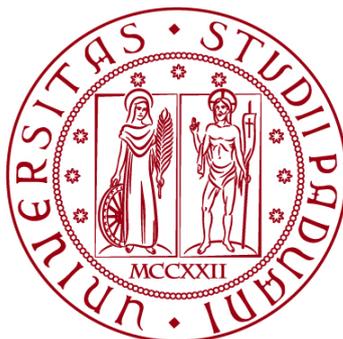
Laureanda: Miriam Gobbato

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**STUDI DI STABILITÀ DI FORMULAZIONI
COSMETICHE: VALUTAZIONE E
VALIDAZIONE DELL'EFFICACIA
PREDITTIVA**

Relatore: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare

Correlatore: Dott.ssa Afra Moretti
Unifarco S.p.A.

Laureanda: Miriam Gobbato

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1 ABSTRACT	1
2 INTRODUZIONE	3
2.1 IL PRODOTTO COSMETICO	3
2.1.1 IL PRODOTTO COSMETICO: ASPETTI NORMATIVI	3
2.1.2 IL PRODOTTO COSMETICO: ASPETTI FORMULATIVI	6
2.1.2.1 EMULSIONI	6
2.1.2.2 INGREDIENTI COSMETICI	7
2.2 PROCESSO DI SVILUPPO DEL PRODOTTO COSMETICO	22
2.3 IL CONTROLLO QUALITÀ DEI PRODOTTI COSMETICI	25
2.4 TEST DI STABILITÀ	29
2.5 UNIFARCO	33
2.6 IL CONTROLLO QUALITÀ DEI COSMETICI IN UNIFARCO	34
2.7 LA LINEA DOLOMIA	35
3 SCOPO DELLA TESI	37
4 MATERIALI E METODI	41
4.1 MATERIALI	41
4.1.1 ANALISI CHIMICO-FISICHE	41
4.1.2 ANALISI MICROBIOLOGICHE	44
4.2 METODI	45
4.2.1 ANALISI DELLA STABILITÀ	45
4.2.2 ANALISI MICROBIOLOGICHE	50
4.2.2.1 METODO DI CONTA IN PIASTRA	50
4.2.2.2 TEST IN USO	55
5 RISULTATI E DISCUSSIONE	57
5.1 VALUTAZIONE DELL' EFFICACIA PREDITTIVA DEGLI STUDI DI STABILITÀ	57
5.1.1 CASI STUDIO	75
5.2 CONFRONTO TRA LA STABILITÀ DEI PRODOTTI FINITI E DELLE MATERIE PRIME IN ESSI CONTENUTE	78
5.3 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA PREDITTIVA DEL CHALLENGE TEST	84
5.4 OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI AZIENDALI	87
6 CONCLUSIONI	91

7 BIBLIOGRAFIA	93
7.1 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	93
7.2 RISORSE ONLINE	94
7.3 NORMATIVA DI RIFERIMENTO	95

1 ABSTRACT

Gli studi di stabilità garantiscono che un prodotto cosmetico mantenga nel tempo le proprietà che lo definiscono, soddisfacendo gli standard di qualità stabiliti.

L'obiettivo di questo progetto di tesi, svolto presso Unifarco S.p.A., Azienda leader nello sviluppo, produzione e distribuzione alle farmacie di prodotti cosmetici, è stato quello di applicare analisi di stabilità ad una linea di cosmetici al fine di validare il loro valore predittivo nella definizione della *shelf-life* dei prodotti. Nello specifico, i prodotti oggetto di studio sono stati presi in considerazione a partire dalle prime fasi di sviluppo fino ai lotti industriali, analizzandone le caratteristiche organolettiche, chimico-fisiche e microbiologiche. I dati sono stati raccolti studiando sia i profili di stabilità dei prodotti e delle materie prime in diverse condizioni sperimentali, sia attraverso analisi microbiologiche.

I risultati ottenuti confermano l'efficacia predittiva dei test di stabilità nei confronti della vita di scaffale dei prodotti. Inoltre, i cambiamenti osservati nei prodotti possono essere messi in relazione con la formulazione degli stessi, in particolare con alcune materie prime. Infine, sulla base dei dati raccolti, viene formulata una proposta di ottimizzazione dei protocolli aziendali attualmente in uso.

2 INTRODUZIONE

2.1 IL PRODOTTO COSMETICO

2.1.1 IL PRODOTTO COSMETICO: ASPETTI NORMATIVI

I prodotti cosmetici rappresentano una categoria eterogenea di prodotti di largo consumo, la cui produzione e commercializzazione è sottoposta a regole specifiche. Sono normati dal Regolamento (CE) n.1223/2009 del Parlamento Europeo, il quale stabilisce norme che ogni prodotto cosmetico immesso sul mercato deve rispettare, al fine di garantire il corretto funzionamento del mercato interno e un livello elevato di tutela della Salute Umana (Regolamento (CE) n.1223/2009). Il prodotto cosmetico, all'articolo 2 del Regolamento, è definito come:

“Qualsiasi sostanza o miscela destinata ad essere applicata 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 esclusivamente o prevalentemente di pulirli, profumarli, modificarne l'aspetto, proteggerli, mantenerli in buono stato o correggere gli odori corporei”.

Per poter classificare un prodotto come cosmetico, quindi, è fondamentale considerare: la formulazione, il sito di applicazione e la funzione del prodotto, tracciando un confine con il dispositivo medico. Inoltre, l'articolo 13 del Regolamento (CE) n.1223/2009 obbliga la persona responsabile a trasmettere in formato elettronico alla Commissione la notifica di ciascun prodotto prima dell'immissione sul mercato europeo. Fin dal primo articolo del Regolamento emerge l'importanza della tutela e il rispetto della salute umana. I prodotti cosmetici devono essere quindi sicuri e l'articolo 3 del Regolamento tratta esplicitamente questo aspetto:

“I prodotti cosmetici messi a disposizione sul mercato sono sicuri per la salute umana se utilizzati in condizioni d'uso normali o ragionevolmente prevedibili, tenuto conto in particolare di quanto segue:

- a) presentazione, compresa la conformità alla direttiva 87/357/CEE,*
- b) etichettatura,*
- c) istruzioni per l'uso e l'eliminazione,*
- d) qualsiasi altra indicazione o informazione da parte della persona responsabile definita dall'articolo 4.*

La presenza di avvertenze non dispensa le persone definite agli articoli 2 e 4 dal rispetto degli altri obblighi previsti dal presente regolamento”.

Nell’articolo 10 in aggiunta è riportato che:

“Al fine di dimostrare la conformità di un prodotto cosmetico all’articolo 3, la persona responsabile garantisce che i prodotti cosmetici, prima dell’immissione sul mercato, siano stati sottoposti alla valutazione della sicurezza sulla base delle informazioni pertinenti e che sia stata elaborata una relazione sulla sicurezza dei prodotti cosmetici a norma dell’allegato I”.

Un aspetto importante, nell’ambito in particolare delle informazioni per i consumatori, è l’etichettatura dei prodotti cosmetici. L’etichetta rappresenta il mezzo attraverso il quale le informazioni sul prodotto sono veicolate all’utilizzatore finale e pertanto deve essere redatta in modo preciso e corretto per garantire ai consumatori la possibilità di operare una scelta consapevole, basata su un adeguato livello di informazione circa le caratteristiche, la composizione e la funzione del prodotto cosmetico.

I prodotti cosmetici possono essere messi a disposizione sul mercato solamente se il contenitore e l’imballaggio recano le seguenti indicazioni, in caratteri indelebili, facilmente leggibili e visibili:

- il nome o la ragione sociale e l’indirizzo completo della Persona Responsabile;
- il contenuto nominale al momento del confezionamento, espresso in peso o in volume;
- la data di durata minima o data di scadenza, cioè la data entro cui il prodotto può essere utilizzato, se opportunamente conservato, ovvero entro cui mantiene inalterate le sue caratteristiche e continua a svolgere la sua funzione iniziale; tale data è preceduta dal simbolo di una clessidra o dalla dicitura «Usare preferibilmente entro:». Se necessario, l’indicazione del periodo di scadenza è completata precisando anche le condizioni di conservazione che devono essere rispettate per garantire la validità del prodotto;
- per i prodotti con durata minima superiore a trenta mesi, non è necessario indicare in etichetta una data di scadenza, ma deve essere riportata un’indicazione relativa al periodo di tempo in cui il prodotto, una volta

aperto il contenitore, può essere utilizzato senza effetti nocivi per il consumatore, preceduta dal simbolo rappresentante un barattolo aperto o dall'acronimo «PAO» (Period After Opening – periodo dopo apertura). Questo periodo è espresso in mesi e/o anni. Sono oggetto di possibili deroghe all'obbligo di riportare una data di scadenza o un PAO i prodotti monodose, i prodotti confezionati in modo tale da evitare il contatto tra il cosmetico e l'ambiente circostante (es. aerosol) e i prodotti per i quali il produttore certifichi che la formula è tale da impedire qualsiasi rischio di deterioramento a seguito di apertura del contenitore;

- le precauzioni di impiego riportate negli Allegati tecnici da III a VI al Regolamento (CE) n.1223/2009;
- il numero del lotto di fabbricazione o il riferimento che permetta di identificare il prodotto cosmetico;
- la funzione del prodotto cosmetico, salvo se risulta dalla sua presentazione;
- l'elenco degli ingredienti, scritti secondo la denominazione comune degli ingredienti contenuta nel glossario stabilito dall'Unione Europea (Regolamento (CE) n.1223/2009) (www.salute.gov.it)

Le indicazioni presenti in etichetta e sulle confezioni di cosmetici consentono al consumatore di conoscerne la durata e di utilizzarli pertanto in modo corretto.

I prodotti cosmetici sono sviluppati e realizzati in modo da rimanere stabili, sicuri ed efficaci per un periodo di tempo, definito *shelf-life*, durante il quale il prodotto rimane conforme alle sue specifiche. Il termine *shelf-life* indica quindi la vita commerciale del prodotto, ovvero l'intervallo di tempo che intercorre fra la produzione e il consumo, senza che ci siano rischi per la salute del consumatore. La *shelf-life* dipende quindi dalle caratteristiche chimico fisiche e microbiologiche del prodotto: durante questo periodo avvengono naturalmente delle modifiche organolettiche ed è responsabilità del produttore definire questo periodo di tempo, svolgendo prove di laboratorio per individuare, con la maggiore precisione possibile, fino a quando è garantita la sicurezza e può essere commercializzato.

Nell'allegato I del Regolamento (CE) n.1223/2009 vengono indicati gli elementi che devono essere riportati nella Valutazione della Sicurezza alla quale ogni

prodotto cosmetico dovrà essere sottoposto prima dell'immissione sul mercato. La Valutazione della Sicurezza è suddivisa in una parte A e in una parte B.

L'allegato I, tra i vari elementi, stabilisce che all'interno della PARTE A siano indicate:

- Caratteristiche chimico-fisiche ed il risultato del test di stabilità del prodotto cosmetico.
- Le caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze o delle miscele. (Regolamento (CE) n.1223/2009)

Pertanto, i test di stabilità sono un aspetto fondamentale che il Valutatore della Sicurezza dovrà esaminare.

2.1.2 IL PRODOTTO COSMETICO: ASPETTI FORMULATIVI

2.1.2.1 EMULSIONI

Le emulsioni sono tra le forme cosmetiche più utilizzate. Un'emulsione, nella forma più semplice, è un sistema bifasico eterogeneo contenente due liquidi immiscibili tra loro, in diversa proporzione, uno dei quali è disperso (fase dispersa, interna o discontinua) nell'altro (fase disperdente, esterna o continua) che lo circonda. Le emulsioni sono sistemi termodinamicamente instabili con la tendenza a ripristinare le due fasi originali separate del sistema. Per ottenere un'emulsione è necessario che le molecole idrofile e quelle lipofile siano mescolate in modo da risultare ragionevolmente stabili. Al momento dell'emulsione la dispersione di una fase in un'altra sotto forma di goccioline provoca un aumento della superficie di contatto tra i due liquidi, cui corrisponde un incremento dell'energia libera del sistema. Infatti, l'energia necessaria a ridurre la dimensione degli aggregati molecolari per formare un'emulsione, minimizzando la tensione interfacciale, deriva dall'agitazione meccanica e dal calore. Tale energia è pari a:

$$L = \gamma \cdot \Delta S$$

Dove γ è la tensione interfacciale e ΔS l'incremento di superficie della fase dispersa. Questa energia viene conservata come energia potenziale e questo porta all'instabilità del sistema: non appena cessa l'agitazione, infatti, le goccioline tendono a coalescere riducendo al minimo possibile la superficie di contatto e minimizzando così l'energia libera. La grandezza delle particelle in un'emulsione è importante perché ne determina l'aspetto e influenza la stabilità dell'emulsione stessa. Le emulsioni differiscono per la composizione, sia quantitativa che

qualitativa, della fase acquosa e oleosa, per il sistema emulsionante e per le sostanze funzionali che caratterizzano il prodotto. Le due fasi generalmente sono olio ed acqua e le emulsioni più comuni sono:

1) Emulsioni O/A (olio in acqua). Il sistema bifasico di un'emulsione O/A consiste in una dispersione in cui l'olio è la fase interna e l'acqua quella esterna (Fig. 1).

La classica composizione di un'emulsione O/A è:

5% : sistema emulsionante

20% : fase lipidica interna

75% : fase acquosa esterna

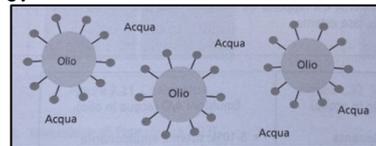


Figura 1 Emulsione olio in acqua
(G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014)

2) Emulsioni A/O (acqua in olio). La fase continua esterna è l'olio e l'acqua è la fase dispersa (Fig. 2).

La classica composizione di un'emulsione A/O è:

5 - 10% : sistema emulsionante

30 - 40% : fase lipidica esterna

50 - 65% : fase acquosa interna

(G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

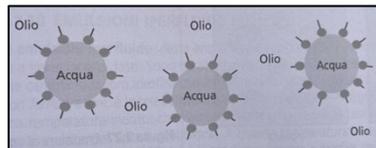


Figura 2 Emulsione acqua in olio
(G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014)

Le forme cosmetiche oggetto di questa tesi sono tutte classificate come emulsioni olio in acqua ed è presente una soluzione. La soluzione acquosa è una delle forme più semplici in ambito cosmetico, per definizione contiene una grande percentuale di acqua. Si tratta infatti di una miscela omogenea costituita dal soluto, componente allo stato disperso, e solvente, in cui avviene la dispersione (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

2.1.2.2 INGREDIENTI COSMETICI

a) Lipidi

I lipidi sono sostanze organiche non solubili in acqua che possono essere di origine organica, vegetale, animale o sintetica. La loro funzione primaria è quella di fungere da veicoli, solventi ed emollienti. I lipidi utilizzati nelle formulazioni cosmetiche possono essere suddivisi in diverse classi, tra le principali: idrocarburi, eteri, esteri glicerici, esteri non glicerici (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014). A titolo

esemplificativo viene riportato l'esempio di un lipide appartenente alla classe degli esteri glicerici, in quanto ben rappresentato nelle formulazioni oggetto di studio:

Trigliceride caprilico/caprico

Il trigliceride caprilico/caprico è un triestere sintetico della glicerina con acidi grassi C8(acido caprilico) -C10(acido caprico) (Fig. 3). Si presenta sotto forma di liquido dal colore debolmente giallo, poco viscoso ed è inodore. È un valido sostituto degli oli vegetali e rispetto a questi ultimi è stabile all'ossidazione perché completamente saturo. Non è tossico né irritante per la pelle, spesso usato come solvente e veicolo di vitamine e attivi nutritivi (Jaworska et al., 2014).

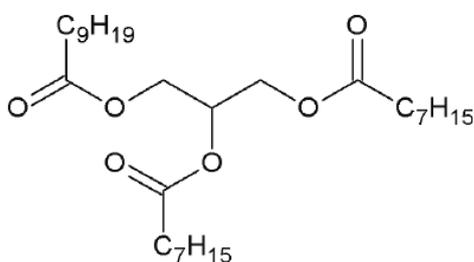


Figura 3 Struttura chimica del Trigliceride caprilico/caprico (Jaworska et al., 2014)

b) Emulsionanti

Gli emulsionanti sono dei composti anfifilici in grado di porsi tra i lipidi e l'acqua; essi formano un film all'interfaccia orientando la porzione polare idrofila verso la fase acquosa e quella apolare lipofila verso la fase oleosa diminuendo così la tensione interfacciale, facilitando la formazione della dispersione riducendone l'instabilità termodinamica. Il sistema emulsionante è quindi fondamentale affinché un'emulsione avvenga ed è costituito da un singolo emulsionante o, di frequente, da una combinazione bilanciata di un emulsionante con uno o più co-emulsionanti. Gli emulsionanti si possono classificare in base alla carica elettrica e in base al rapporto idrofilia/lipofilia.

Classificazione per carica elettrica:

- ANIONICI: etossilati e non etossilati
- CATIONICI: etossilati e non etossilati
- ANFOTERI: non etossilati
- NON IONICI: etossilati e non etossilati

Classificazione per idrofilia/lipofilia:

- LIPOFILI: non ionici

- IDROFILI: anionici, cationici, anfoteri e non ionici

La natura degli emulsionanti determina il loro HLB (Hydrophylic-Lipophilic Balance), ovvero l'equilibrio idro-lipofilo e dunque il tipo di emulsione che essi possono originare. Il bilancio idrofilo-lipofilo è una misura del grado di idrofilicità o di lipofilità dell'emulsionante, determinato in base alle differenti regioni della molecola. Tale sistema include valori numerici da 0 (lipide puro) a 20 (acqua) che indicano l'affinità alla parte idrofila o lipofila di un emulsionante. Emulsionanti con HLB superiore a 10 sono idrofili e quindi tendenzialmente solubili in acqua mentre quelli con HLB inferiore a 10 sono lipofili e quindi tendenzialmente solubili negli oli. In base a questa "scala", semplificando, gli emulsionanti con HLB:

- basso (tra 4 e 6) sono molecole con bassa idrofilia (impiegati nelle emulsioni A/O)

- alto (tra 8 e 18) sono emulsionanti ad alta idrofilia (impiegati nelle emulsioni O/A)

La combinazione fra emulsionanti idrofili ad alto HLB ed emulsionanti lipofili a basso HLB permette di ottenere coppie di emulsionanti che consentono la realizzazione di emulsioni O/A stabili. Gli emulsionanti sono in grado di creare una barriera intorno alle goccioline isolandole e riducendone la tensione interfacciale. Un emulsionante ideale deve essere stabile, inerte, non irritante, non tossico, inodore, incolore, insapore e utilizzabile a basse concentrazioni (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

Viene riportato qui di seguito a titolo d'esempio un emulsionante presente in alcune formulazioni cosmetiche oggetto di studio, in particolare appartiene alla categoria di emulsionanti idrofili anionici. Gli emulsionanti anionici sono caratterizzati da un'efficacia di solito superiore ai non ionici e vengono utilizzati quindi in percentuali minori. Molti di loro sono solubili o disperdibili in acqua e sono quasi sempre impiegati in associazione a un emulsionante di contrasto lipofilo. L'emulsionante in questione è *Stearoil lattilato di sodio*: rientra nella categoria di esteri tra acidi grassi e idrossiacidi. È un emulsionante anionico completamente di origine naturale, derivato dal sale sodico dell'acido lattico e dell'acido stearico (Fig. 4). Può essere utilizzato con altri emulsionanti per conferire stabilità alle emulsioni.

Viene utilizzato in concentrazioni che variano dallo 0,5% al 2% ed è preferibilmente inserito in fase oleosa (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

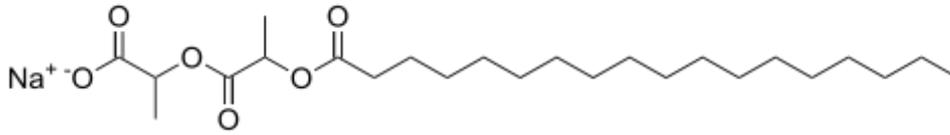


Figura 4 Stearoil lattilato di sodio (www.chemspider.com)

c) Modificatori reologici

I modificatori reologici sono sostanze che, aggiunte ad una sostanza o a una miscela di sostanze, ne modificano il comportamento reologico. Vengono utilizzati per gelificare soluzioni, viscosizzare emulsioni e contribuiscono alla stabilità di queste ultime. Il loro meccanismo d'azione consiste nel creare una rete in grado di strutturare il solvente.

Le sostanze utilizzate come modificatori reologici vengono classificate seguendo diversi criteri, per esempio secondo la loro origine:

- naturali
- naturali modificati
- sintetici
- inorganici

Dal punto di vista applicativo possiamo invece suddividerli in:

- modificatori reologici idrofili
- modificatori reologici lipofili

(G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

Come esempio vengono riportati due modificatori reologici impiegati nelle emulsioni oggetto di studio.

-Poliacrilato di sodio. Polimero sintetico, modificatore reologico idrofilo. Si tratta del sale sodico dell'acido poliacrilico, un polimero ad alto peso molecolare i cui monomeri sono quelli di acido acrilico (Fig. 5).

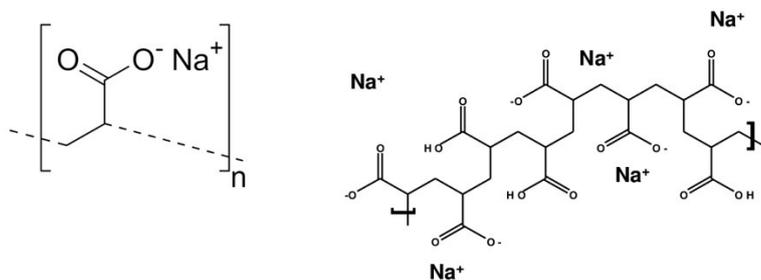


Figura 5 Formula chimica del Poliacrilato di sodio. A sinistra il monomero del Poliacrilato di sodio, a destra un dettaglio dei legami polimerici (www.magazine.x115.it)

Il poliacrilato di sodio si presenta come una polvere cristallina bianca. La percentuale di utilizzo varia dallo 0,2 al 3% circa a seconda dell'impiego. Il range di pH ottimale per il suo utilizzo varia tra 6 e 12 (www.ulprospector.com/en/eu).

- *Alcol Cetilstearylco*: Modificatore reologico lipofilo. Con Alcol Cetilstearylco si intende una miscela di alcoli cetilico e stearylco, alcoli grassi costituiti rispettivamente da 16 e 18 atomi di carbonio, completamente saturi e con catena lineare (Fig. 6). Poiché questi alcoli grassi presentano una testa polare costituita dall'ossidrile e una lunga catena alifatica sono dotati di proprietà co-emulsionanti. Si presenta come un solido bianco in granuli o scaglie dalla consistenza cerosa, insolubile in acqua e solubile in alcool (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

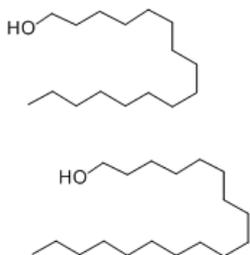


Figura 6 Formula chimica degli alcoli cetilico (sopra) e stearylco (sotto) (www.chemicalbook.com)

d) Stabilizzanti della formula

-CONSERVANTI

La protezione dall'inquinamento microbico rappresenta un aspetto importante nella formulazione. Il prodotto cosmetico presenta infatti una matrice formulativa generalmente molto complessa, ed ogni ingrediente concorre alla formazione di un insieme biologicamente attaccabile. In particolare, tanto più un cosmetico è ricco di acqua, ha un pH neutro o presenta altri nutrienti (acidi grassi, proteine, amminoacidi, vitamine, minerali), tanto più è soggetto all'inquinamento microbico

(G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014). Vengono utilizzati i conservanti allo scopo di impedire la proliferazione dei microrganismi nel prodotto cosmetico. I conservanti sono definiti dall'articolo 2 del Regolamento cosmetico 1223/2009 come: *“Sostanze destinate esclusivamente o prevalentemente ad inibire lo sviluppo di microrganismi nel prodotto cosmetico”*. Come la definizione suggerisce, essi devono essere introdotti in concentrazione sufficiente a preservare il prodotto dall'inquinamento microbico, garantendo la sua vita a scaffale. L'impiego di queste sostanze è strettamente vincolato dal Regolamento: tutte le sostanze utilizzate come conservanti sono citate nell'allegato V. In allegato sono indicati la concentrazione massima d'uso, eventuali limitazioni per quanto riguarda la tipologia di cosmetico dove la sostanza può essere utilizzata e avvertenze da riportare in etichetta (Regolamento (CE) n. 1223/2009).

Un conservante dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- ✓ Attività antimicrobica: lo spettro d'azione deve essere il più ampio possibile (Gram+, Gram-, funghi, lieviti) alla minor dose possibile.
- ✓ Tossicità: non deve essere irritante o tossico alle dosi abituali di impiego.
- ✓ Solubilità: deve essere tipicamente idrosolubile o comunque facilmente solubilizzabile nel sistema in cui è impiegato.
- ✓ Stabilità: deve essere stabile alle condizioni di temperatura e pH.
- ✓ Compatibilità con altri componenti: deve essere compatibile con tutti gli ingredienti e non perdere l'attività in loro presenza.
- ✓ Compatibilità con il pack: non deve permeare o corrodere il contenitore.
- ✓ Colore-odore: essere incolore e inodore.
- ✓ Costo: deve avere un costo contenuto.

(Steinberg, 2006)

In genere, nelle formulazioni si ricorre a miscele di più sostanze per sfruttare eventuali fenomeni sinergici, abbassare la concentrazione di ogni singola molecola per diminuirne la tossicità, ed aumentare lo spettro d'azione. Un singolo conservante solitamente ha uno spettro d'azione limitato, per cui proteggere il prodotto cosmetico con una singola molecola risulta inefficace, per questo vengono definiti dei 'sistemi' di conservanti.

Il meccanismo d'azione delle molecole conservanti è vario e non sempre ben identificato. Ad oggi sono note diverse strategie d'azione. Gli antimicrobici

possono inibire la crescita o provocare la morte del microorganismo in diversi modi:

-bloccando la sintesi delle sostanze che formano la parete cellulare batterica, facendole perdere gli effetti protettivi;

-modificando la permeabilità della membrana cellulare batterica o distruggendola, provocando la perdita del materiale intracellulare e la conseguente morte del batterio;

-interferendo con la sintesi di proteine ed enzimi microbici, con conseguente loro denaturazione e inattivazione (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

I conservanti antimicrobici vengono suddivisi in base alla loro composizione chimica in:

Acidi organici, alcoli e fenoli, aldeidi e cessori di formaldeide, isotiazolinoni, composti dell'ammonio quaternario e composti azotati (Halla et al., 2018).

Alcuni esempi sono le aldeidi che possono reagire con i gruppi aminici e amidici delle proteine e degli amminoacidi dei microrganismi; gli alcoli che possono estrarre lipidi dalla parete e dalla membrana cellulare; i fenoli che vengono assorbiti alla superficie cellulare provocando la distruzione della membrana; i sali di ammonio quaternario che reagiscono con i lipidi della parete e provocano distruzione della membrana cellulare; i metalli possono causare la riduzione di gruppi tiolici con conseguente blocco di talune attività enzimatiche (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

In particolare, i due conservanti presenti nell'Allegato V del Regolamento cosmetico e coinvolti nelle formulazioni oggetto di studio sono il:

A) *Deidroacetato di sodio*. Si tratta di un sale dell'acido deidroacetico che possiede attività scarsa nei confronti dei batteri Gram + e Gram –, ma attività discreta verso i funghi (Fig. 7). La sua attività è fortemente dipendente dal pH, infatti la sua forma attiva è quella dell'acido libero. Il pH ideale è di 5-6.5. Il suo meccanismo d'azione consiste nell'acidificazione dell'ambiente esterno ai microrganismi, rendendolo sfavorevole alla crescita microbica (Steinberg, 2006).

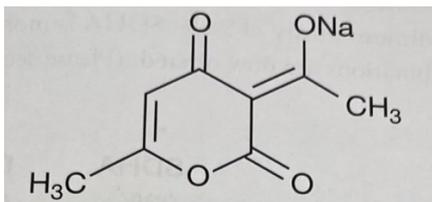


Figura 7 Struttura chimica del Deidroacetato di sodio (Steinberg, 2006)

B) *Isopropil metil fenolo*. Si tratta di un derivato del cresolo. È attivo principalmente nei confronti di lieviti e muffe (Fig. 8). È stabile fino a pH 11. Esso agisce determinando un'azione lesiva su proteine deputate a processi enzimatici di importanti funzioni metaboliche dei microrganismi (Steinberg, 2006).

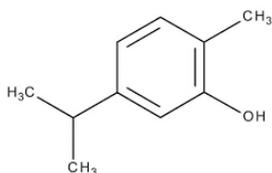


Figura 8 Struttura chimica dell'Isopropil metil fenolo (www.sigmaaldrich.com)

Nelle Figure (9-12) che seguono sono riportati esempi di altri conservanti suddivisi in base alla classe chimica:

Organic Acids		Alcohols and Phenols			
 Propionic acid CAS:79-09-4	 Sorbic acid CAS:110-44-1	 Triclosan CAS:3380-34-5	 Chloroxylenol CAS:88-04-0	 Chlorobutanol CAS:57-15-8	
 Benzoic acid CAS:65-85-0	 Salicylic acid CAS:69-72-7	 o-phenylphenol CAS:90-43-7	 Dichlorobenzyl alcohol CAS:1777-82-8	 Phenoxyethanol CAS:122-99-6	
 Dehydroacetic acid CAS:520-45-6		 4-Hydroxybenzoic acid CAS:99-96-7 R- Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl (Parabens)	 Chlororesol CAS:59-50-7	 Benzyl alcohol CAS:100-51-6	

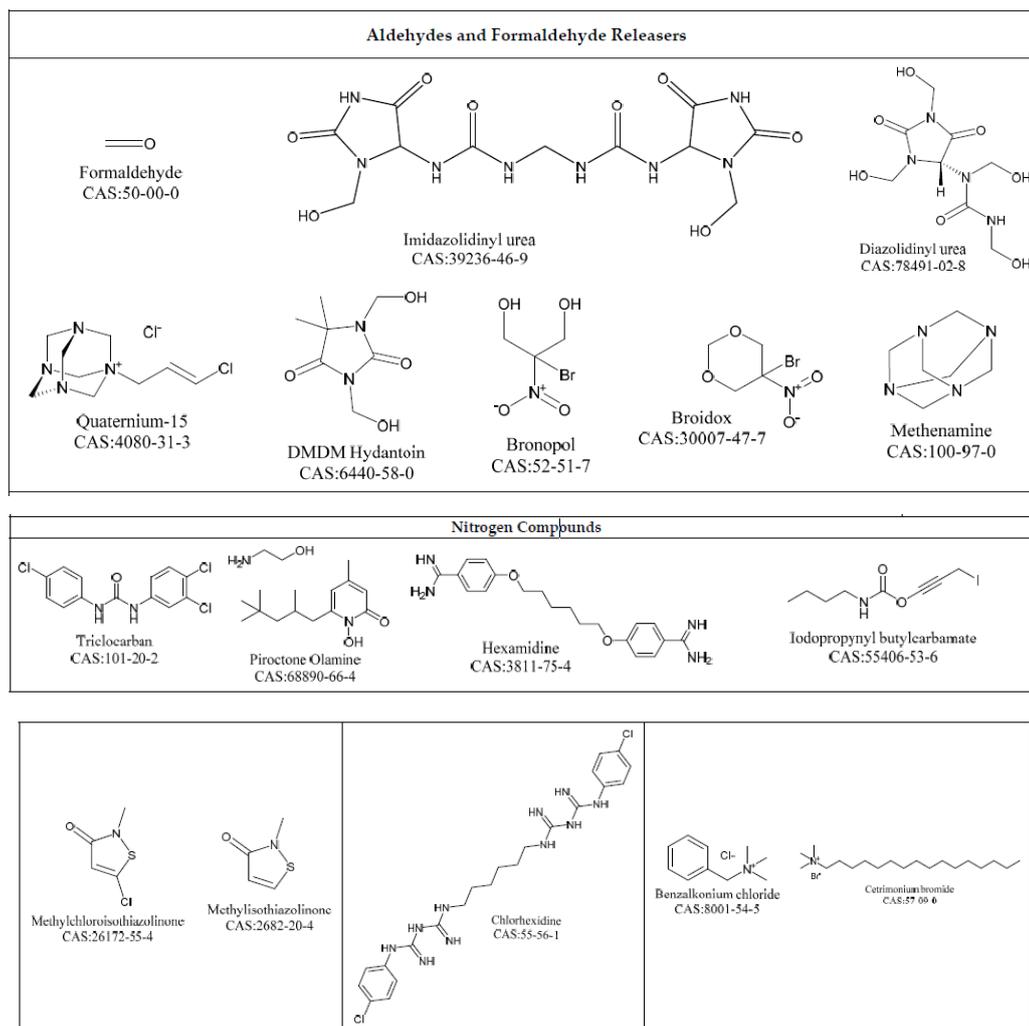


Figure 9,10,11,12 esempi di strutture chimiche di alcuni conservanti utilizzati nei cosmetici (da Halla et al., 2018)

-CONSERVANTI “NON CONSERVANTI”

Altra classe di conservanti presenti nelle formulazioni sono i conservanti ‘non conservanti’. Si tratta di ingredienti multifunzionali ed attivi con proprietà antimicrobiche e non presenti nell’allegato V. Queste molecole contribuiscono a preservare la formulazione cosmetica, tuttavia è sottointeso che il loro impiego va controllato su ogni singola formula per essere certi dell’adeguatezza della preservazione (Herman, 2019). Tra le principali sostanze alternative possiamo citare diverse classi, in particolare quelle contenute nelle formulazioni oggetto di studio sono:

- Glicoli: *Glicole pentilenico, Glicole caprilico, Etilsilglicerina*

Il *Glicole pentilenico* (Fig. 13) è un agente multifunzionale che ha un'eccellente efficacia come agente biostatico e fungistatico (Steinberg, 2006).

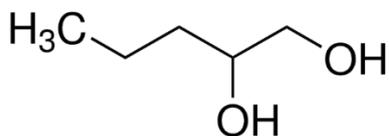


Figura 13 Struttura chimica del *Glicole pentilenico* (www.sigmaaldrich.com)

Il *Glicole caprilico* (Fig. 14) crea un ambiente biostatico che impedisce la crescita di microrganismi. È principalmente efficace contro i batteri e può essere combinato con un agente di controllo di lieviti e muffe, per una protezione ad ampio spettro (www.ulprospector.com/en/eu).

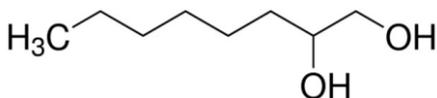


Figura 14 Struttura chimica del *Glicole caprilico* (www.sigmaaldrich.com)

Etilsilglicerina (Fig. 15) è un additivo multifunzionale per cosmetici e viene utilizzato come agente di potenziamento per ottenere una migliore protezione contro la crescita microbica (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

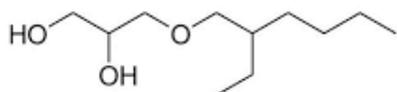


Figura 15 Struttura chimica dell'*Etilsilglicerina* (www.reaxys.com)

- Esteri della glicerina: il *Gliceril caprilato* è un monoestere multifunzionale che fornisce controllo antimicrobico nelle formulazioni permettendo di abbassare il dosaggio dei conservanti tradizionali (Fig. 16).

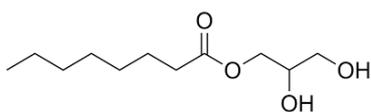


Figura 16 Struttura chimica del *Gliceril caprilato* (www.reaxys.com)

- *Anisato di sodio e Levulinato di sodio*

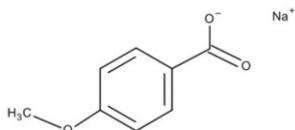


Figura 17 Struttura chimica dell'anisato di sodio (www.sigmaaldrich.com)

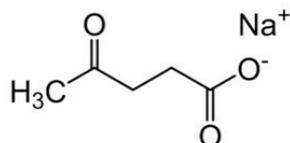


Figura 18 Struttura chimica del levulinato di sodio (www.reaxys.com)

L'anisato di sodio (Fig. 17) è il sale sodico dell'acido p-anisico. È classificato come antimicrobico e aromatizzante. Agisce come un agente antimicotico e, se abbinato al levulinato di sodio (Fig. 18), i due ingredienti creano un conservante completo per i cosmetici. Il levulinato di sodio viene utilizzato come conservante ad ampio spettro, abbinato all'anisato, per la sua attività di contrastare la crescita dei microorganismi aerobi e non (www.ulprospector.com/en/eu).

- Lipoaminoacidi: *Capriloil glicina, Undecilenoil glicina*

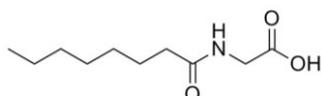


Figura 19 Struttura chimica Capriloil glicina (www.axios-research.com)

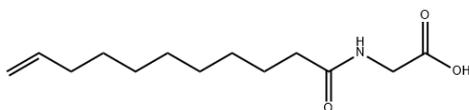


Figura 20 Struttura chimica Undecilenoil glicina (www.chemicalbook.com)

Capriloil glicina (Fig. 19) è un lipoamminoacido ottenuto dall'acilazione dell'aminoacido glicina con acido caprilico. Si presenta sotto forma di polvere bianca solubile in soluzione basica acquosa. Ha proprietà antimicrobiche. Il suo uso consente di ridurre la quantità di conservanti da utilizzare in formulazioni cosmetiche in quanto può limitare la crescita dei batteri. Undecilenoil glicina (Fig.

20) permette di formulare con basse concentrazioni di conservante (www.ulprospector.com/en/eu).

- Acidi organici alternativi: L'*acido p-anisico* (Fig. 21), oltre alla sua funzione di componente aromatico, ha la capacità di stabilizzare biologicamente le formulazioni cosmetiche (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

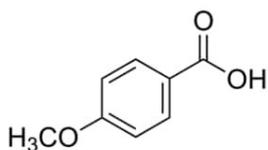


Figura 21 Struttura chimica dell'*acido p-anisico*(www.sigmaaldrich.com)

-CHELANTI

La presenza incontrollata di ioni metallici in un prodotto può portare a conseguenze quali: formazione di complessi colorati, fenomeni di perossidazione o fotodegradazione, precipitazione di sostanze, inattivazione di alcuni conservanti. Per ridurre tali fenomeni si ricorre all'uso di sequestranti, molecole in grado di legare gli ioni metallici formando complessi solubili in acqua, detti chelati. A questo proposito nominiamo l'acido etilendiaminotetracetico (EDTA), nei vari gradi di salificazione in quanto è il sequestrante più utilizzato (Fig. 22). Molto comuni sono i sali sodici: *disodium EDTA*, *trisodium EDTA* e *tetrasodium EDTA* (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

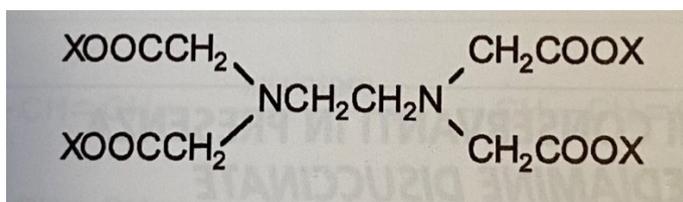


Figura 22 Struttura chimica EDTA e i suoi sali (da G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014)

-ANTIOSSIDANTI

Gli antiossidanti sono sostanze utilizzate per preservare il prodotto finito dai fenomeni di ossidazione. Tra i vari fenomeni, quello dell'autossidazione è uno dei più gravi in quanto i prodotti alterati oltre a presentare caratteristiche organolettiche alterate, si comportano da irritanti cutanei. Questo fenomeno dell'autossidazione è

legato per lo più alla presenza di lipidi insaturi, quindi generalmente a prodotti naturali. I fattori che influiscono sull'ossidazione comprendono la disponibilità di ossigeno, il grado di insaturazione degli acidi grassi e la presenza di cofattori come luce, metalli e calore. Le reazioni di ossidazione possono produrre radicali, responsabili dell'avvio di una reazione di propagazione. Gli antiossidanti hanno la funzione di terminare queste reazioni a catena intervenendo sui radicali intermedi ed inibendo altre reazioni di ossidazione ossidandosi essi stessi (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

Tra i più comuni antiossidanti troviamo il seguente, che è ben rappresentato anche nelle formule oggetto di studio:

Pentaeritritile Tetra-di-t-butil Idrossiidrocinnamato. Il pentaeritritile tetra-di-t-butil idrossiidrocinnamato è il cinnamato tetraestere del pentaeritritolo, un antiossidante liposolubile, conforme alla struttura molecolare mostrata in Figura 23.

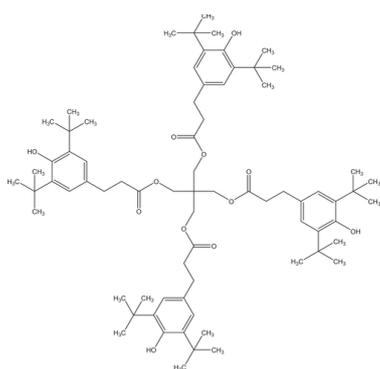


Figura 23 Struttura chimica Pentaeritritile tetra-di- t-butil idrossiidrocinnamato (da Johnson et al., 2018)

È un solido bianco amorfo il cui punto di fusione è superiore a 100°C e con una solubilità in acqua molto bassa e un alto grado di lipofilia e viene utilizzato a concentrazioni fino allo 0,8% (Johnson et al., 2018)

-STABILIZZATORI DI pH

Il pH delle formulazioni cosmetiche è fondamentale per diversi aspetti tra cui l'attività del sistema conservante, la compatibilità cutanea, e la stabilità dei polimeri presenti in formula. Tra gli ingredienti cosmetici vengono pertanto utilizzati i

cosiddetti stabilizzatori di pH che servono per aumentare o diminuire il pH che si instaura in una formulazione.

Nello specifico esempi di stabilizzatori di pH sono:

- *Acido citrico*

L'acido citrico (Fig. 24) agisce nei cosmetici come regolatore del pH, in particolare funge da acidificante. L'acido citrico si trova in forma solida e strutturalmente è un α -idrossiacido (AHA), è solubile in acqua e in alcuni liquidi organici ed è molto idrofilo (www.ulprospector.com/en/eu).

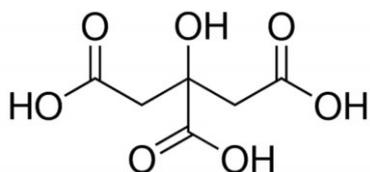


Figura 24 Struttura chimica dell'acido citrico (www.sigmaaldrich.com)

- *Idrossido di sodio*

L'idrossido di sodio (NaOH) regola l'acidità in quanto forte alcalinizzante.

e) Principi attivi

Tra i principi attivi presenti nelle formulazioni cosmetiche troviamo gli estratti naturali. Sono degli ingredienti attivi a cui sono legate molte funzionalità dovute alle piante da cui essi hanno origine. In particolare, la classe chimica principalmente coinvolta è quella dei polifenoli. Un esempio è il *Kaempferolo*, un composto caratteristico della classe dei flavonoidi, presente nell'estratto di zafferano utilizzato come ingrediente in alcuni cosmetici oggetto di questo studio (Fig.25). I flavonoidi, categoria molto vasta di prodotti secondari naturali delle piante, sono composti chimici molto diffusi in natura e hanno tutti in comune una struttura polifenolica a 3 anelli (Panche et al., 2016). Anche l'estratto di tarassaco, presente nelle formule di prodotti analizzati, è ricco in polifenoli, tra cui la luteolina (Fig. 26), che appartiene alla famiglia dei flavoni (Bylka et al., 2010).

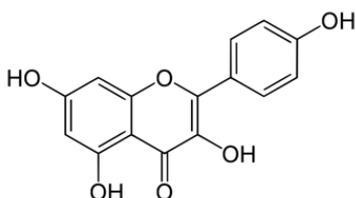


Figura 25 Struttura chimica del Kaempferolo (Panche et al., 2016)

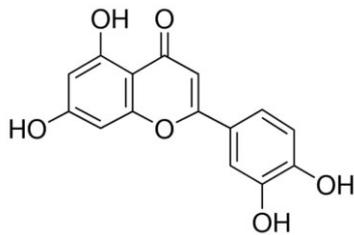


Figura 26 Struttura chimica della Luteolina (www.sigmaaldrich.com)

h) Coloranti

I coloranti in cosmetica sono principalmente utilizzati per migliorare o modificare le caratteristiche estetiche del prodotto al fine di differenziarne o definirne l'aspetto. I coloranti vengono suddivisi in naturali e sintetici. I primi sono derivati da fonti vegetali o in qualche caso animali, alcuni sono idrosolubili, altri liposolubili. I coloranti sintetici sono materie prime coloranti con caratteristiche di elevata purezza e migliore stabilità. Anche in questo caso sono disponibili sia sostanze liposolubili che idrosolubili. Dal punto di vista chimico, fra le classi di coloranti di sintesi più comuni nell'industria cosmetica troviamo i derivati azoici, di cui fa parte il colorante presente in alcune formulazioni cosmetiche oggetto di studio (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014). Nello specifico si tratta di una polvere rossa con la seguente struttura chimica (Fig. 27):

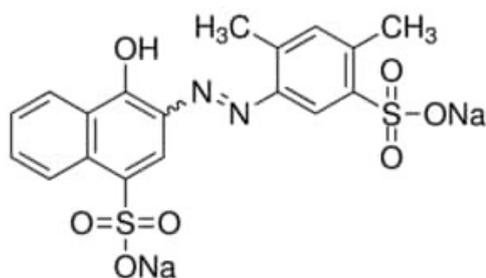


Figura 27 Struttura chimica del colorante (www.sigmaaldrich.com)

i) Profumi

Ciascun profumo ha precise caratteristiche e una formula di composizione che lo differenzia da qualsiasi altro. Il tipo e le concentrazioni di molecole olfattive e del solvente in cui esse sono disciolte ne determinano due rami principali:

- la profumeria alcolica, che fa riferimento ai prodotti che si applicano direttamente sulla cute o sugli abiti;

-la profumeria applicata, dove minime percentuali di molecole odorose entrano nella composizione di altri prodotti cosmetici. In quest'ultima le percentuali di profumo sono adattate a seconda del tipo di prodotto cosmetico (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

I profumi coinvolti nei prodotti oggetto di questa tesi sono miscele di profumi naturali e sintetici e la classe di molecole chimiche che principalmente determina le fragranze sono i terpeni e terpenoidi. Tra queste molecole troviamo ad esempio il *Gamma-Terpinene* (Fig. 28) monoterpene responsabile di una fragranza legnosa; *tetraidro-4-metil-2-(2-metilpropen-1-enil)pirano* (ossido di rosa, Fig. 29) monoterpene che si trova nella rosa e nell'olio di rosa (Stepanyuk & Kirschning, 2019).

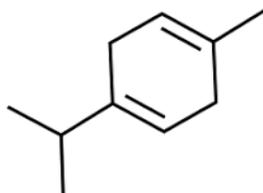


Figura 28 Struttura chimica del *Gamma-Terpinene* (www.chemspider.com)

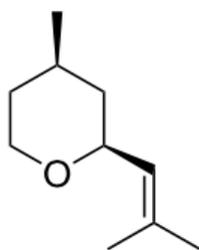


Figura 29 Struttura chimica del *tetraidro-4-metil-2-(2-metilpropen-1-enil)pirano* (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

2.2 PROCESSO DI SVILUPPO DEL PRODOTTO COSMETICO

Lo sviluppo di un prodotto cosmetico è caratterizzato da una serie di fasi che coinvolgono ambiti e ruoli con competenze differenti che interagiscono per raggiungere l'obiettivo di realizzare un prodotto innovativo, efficace, sicuro, stabile e di qualità.

Nello specifico un nuovo progetto viene preliminarmente studiato attraverso un modello che viene chiamato, per la sua forma ad imbuto, *funnel* dell'innovazione.

Quest'ultimo segue una serie di fasi, ciascuna delle quali ha degli obiettivi parziali ed è costituito da una serie di attività specifiche, ben definite per il loro raggiungimento. Al termine di ciascuna fase si svolge un momento di controllo, durante il quale si realizza un processo decisionale in relazione al proseguimento o meno delle attività e conseguente passaggio alla fase successiva. Con l'avanzare delle fasi l'incertezza legata a tutto il processo va diminuendo, mentre aumentano le possibilità di realizzarlo con successo (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

Il funnel può essere schematizzato in una prima fase consistente nella generazione delle idee da parte del marketing che formula un *brief* relativo sia alla formulazione che al packaging. Le considerazioni successive sul prodotto cosmetico coinvolgono l'area di Ricerca e Sviluppo e riguardano in particolare la sua corretta formulazione. Vengono in questa fase studiati e valutati: i meccanismi fisiologici e metabolici delle strutture della cute e dei suoi annessi, allo scopo di definire i meccanismi d'azione più adatti, sviluppare strategie formulative e utilizzare sostanze funzionali più compatibili per raggiungere i risultati auspicati. Al fianco di queste valutazioni viene fatta una scelta sulle forme cosmetiche più adatte a soddisfare le esigenze espresse dal *brief* iniziale, tenendo in considerazione il ruolo fondamentale che il veicolo cosmetico svolge sulle caratteristiche di gradevolezza e di sensorialità del prodotto. Una volta definite le caratteristiche della formulazione cosmetica vengono prodotti dei prototipi sperimentali, primo passaggio che si inserisce in quello che viene definito il processo di industrializzazione del prodotto cosmetico. Altro elemento affrontato in queste fasi preliminari è lo sviluppo del packaging che segue in parallelo lo sviluppo del prodotto. Un aspetto importante infatti riguarda la compatibilità tra il packaging primario e prodotto, poichè svolge un ruolo di protezione, ma ha anche molteplici altre funzioni, da quella comunicativa esplicita e sensoriale immediata a quella di elemento determinante per il dosaggio e l'utilizzo del prodotto. Per gli stessi motivi, altrettanto importante è il packaging secondario ovvero tutto quello che non è a diretto contatto con il prodotto.

Il processo di industrializzazione, anche detto scale-up, è il processo di aumento di scala di un prodotto, lungo il suo iter di sviluppo. Esso è funzionale alla conoscenza del comportamento del prodotto al variare del volume di produzione. L'industrializzazione, dunque, può essere definita come quella serie di operazioni che devono portare il cosmetico dal laboratorio alla fabbrica. Durante questa serie

di fasi si deve verificare in un impianto industriale la riproducibilità di quello che si è ottenuto in laboratorio, apportando, se è il caso, le opportune modifiche. Infatti, se non si esegue attentamente il percorso, c'è il rischio di ottenere nella pratica industriale risultati totalmente differenti da quelli realizzati in laboratorio e andare incontro a delle mutazioni incontrollate, dovute alle masse in gioco, ai tempi di lavorazione, agli impianti utilizzati. Le fasi di sviluppo prodotto e di industrializzazione sono necessarie per definire i limiti di accettabilità delle variabili chiave che sono gli standard di riferimento nell'arco di vita del prodotto sul mercato. È dunque importante far sì che questa variabilità sia accettabile e che non pregiudichi le caratteristiche e la stabilità del prodotto. Il processo di industrializzazione diventa un altro punto cardine che vede interfacciarsi diverse realtà aziendali che ruotano attorno al prodotto cosmetico e al suo successo in termini di stabilità, durevolezza, efficacia e piacevolezza d'uso (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014). In generale è possibile schematizzare il processo di scale-up nei seguenti passaggi:

PROTOTIPO: di norma parte da una formula che porta a un prodotto realizzato in piccola scala, poche decine di grammi. Gli scopi principali del prototipo sono l'elaborazione e valutazione interna da parte del laboratorio di Ricerca e Sviluppo. In generale da esso si possono ricavare dati macroscopici e l'obiettivo è definire se la formula sarà calzante l'input di prodotto (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014).

I prototipi sviluppati vengono sottoposti a diversi test, in particolare viene valutata la sensorialità e la tenuta della formula alla centrifuga.

PRE-PILOTA: questa prova utilizza una macchina a scala superiore, 4-5 chili, ed è importante che abbia caratteristiche più simili a quelle della fabbricazione, per preparare un campione rappresentativo per valutazioni sensoriali e di stabilità. Nell'analisi di questa prova si indagano contemporaneamente due aspetti:

- il laboratorio Ricerca e Sviluppo valuta la stabilità della formula dal punto di vista delle analisi organolettiche e chimico-fisiche;

- il laboratorio di Controllo Qualità valuta la compatibilità della formula con il packaging.

Nel corso delle varie fasi si susseguono parallelamente un'analisi dei parametri con tempi e modalità scanditi dai protocolli aziendali e vengono portati avanti test di sicurezza necessari per lo sblocco del prodotto.

Se le prove, in particolare la stabilità chimico-fisica e microbiologica, forniscono dei risultati soddisfacenti, si può procedere con lo scale-up.

PILOTA: i lotti in scala pilota raggiungono fino a 20 chili. Su questa fase pilota il laboratorio di Controllo Qualità svolge uno studio di stabilità analizzando sia la formula in un vaso di vetro, sia nel packaging originale, seguendo il protocollo interno che scandisce i tempi e le analisi. Un momento cardine dell'analisi della stabilità della prova pilota è dopo i primi 3 mesi momento in cui, a seconda dell'andamento, viene deciso se procedere alla fase successiva di scale-up, il primo lotto industriale.

INDUSTRIALE: in questa fase il prodotto è di fatto già industriale, ma permane la possibilità di apportare piccole correzioni ed adattamenti legati alla scala accresciuta (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014). La prima prova industriale è solitamente di taglio 150 chili, si prosegue poi nello scale-up fino ad arrivare al taglio industriale che diventerà taglio standard, ed è su questa che il laboratorio di Controllo Qualità imposta e segue un ulteriore studio di stabilità.

Il fatto di aumentare gradualmente le quantità prodotte nel corso dello scale-up permette, in particolare nel passaggio più significativo tra pilota e prima industriale, di avere un maggior controllo della formula e, nel caso in cui ci sia la necessità di adattamenti dovuti all'aumento di scala, che non ci sia un eccessivo spreco di tempo, materiali e prodotto.

2.3 IL CONTROLLO QUALITÀ DEI PRODOTTI COSMETICI

Il controllo della qualità dei cosmetici è un processo fondamentale per la produzione e la successiva commercializzazione di tali prodotti.

Il Regolamento Europeo n.1223/2009 disciplina la produzione e l'immissione in commercio nell'Unione Europea dei prodotti cosmetici e all'articolo 3 riporta che i prodotti cosmetici messi a disposizione sul mercato devono essere sicuri per la

Salute Umana se utilizzati in condizioni d'uso normali o ragionevolmente prevedibili. Altro requisito del Controllo Qualità è l'attuazione delle Buone Pratiche di Fabbricazione. Il Regolamento Europeo infatti stabilisce elevati requisiti di sicurezza dei prodotti cosmetici per il consumatore; tra questi, nell'articolo 8 richiede che tutti i prodotti cosmetici immessi sul mercato Europeo siano conformi alle Buone Pratiche di Fabbricazione (Good Manufacturing Practices, GMP) (Regolamento (CE) n.1223/2009).

Il rispetto dei requisiti GMP è divenuto obbligatorio e l'adozione della norma armonizzata ISO 22716 è fondamentale per dimostrarne la conformità.

In particolare, la Norma ISO 22716, che fornisce le linee guida per la produzione, il controllo, la conservazione e la spedizione dei prodotti cosmetici, al punto 9 stabilisce l'operatività del laboratorio Controllo Qualità:

“Il laboratorio di controllo della qualità è responsabile di garantire che siano eseguiti i controlli necessari e pertinenti, nell'ambito della propria attività, volti al campionamento e alle prove, in modo che i materiali siano rilasciati per l'uso e i prodotti siano rilasciati per la spedizione solo se la loro qualità soddisfa i requisiti dei criteri di accettazione”.

Le attività di controllo prevedono analisi di tipo microbiologico e chimico-fisico.

Le analisi microbiologiche rappresentano un passaggio fondamentale in tutte le fasi di vita del prodotto, dalla formulazione al prodotto finito. Vengono svolte nello specifico su materie prime, semilavorati, prodotti finiti confezionati e acqua di processo seguendo le norme ISO 21148 (Istruzioni generali per l'analisi microbiologica), 21149 (Conta e ricerca dei batteri mesofili aerobi), 16212 (Conta lieviti e muffe). In particolare, lo scopo della norma ISO 21148, è quello di contribuire a garantire che le tecniche generali utilizzate siano le stesse in tutti i laboratori che adottano gli stessi standard, in modo da ottenere risultati omogenei in laboratori diversi e per contribuire alla protezione della salute del personale di laboratorio prevenendo il rischio di infezione. Nella ISO vengono quindi riportati esempi di precauzioni da assumere durante le analisi microbiologiche, queste sono necessarie non solo per motivi di igiene, ma anche per garantire la buona riproducibilità e affidabilità dei risultati. Non sono elencate tutte le precauzioni da prendere in tutte le circostanze, ma sono descritte le principali misure da assumere

per la preparazione, sterilizzazione e conservazione dei terreni e dell'apparecchiatura. Tutte le misure e gli accorgimenti necessari devono essere messi in atto per ottenere analisi in cui i microrganismi isolati o enumerati provengano unicamente dal campione e che questi non contaminino l'ambiente.

Nel dettaglio nella norma sono descritte linee guida per: l'organizzazione dei locali in termini di ubicazione e dotazione, le attrezzature necessarie, il personale in termini di igiene e competenza, la preparazione dei materiali, la preparazione dei terreni e dei campioni ed infine le pratiche operative a cui attenersi.

Le UNI EN ISO 21149 e 16212 danno indicazioni nello specifico su come eseguire l'analisi di batteri, lieviti e muffe (la metodica verrà trattata più ampiamente nel capitolo dedicato ai materiali e metodi). L'applicazione di entrambe le ISO permette la rilevazione di un numero di colonie per unità di volume (ml) o peso (g) nel prodotto finale, in quanto prevedono l'inoculo di una certa quantità nota di prodotto cosmetico su terreno agar e la conta delle colonie dopo alcuni giorni di incubazione e i risultati sono espressi in UFC/ml o UFC/g. Questi valori hanno limiti chiaramente stabiliti dalla legislazione Europea.

Le analisi organolettiche e chimico-fisiche determinano e verificano le caratteristiche del prodotto nelle varie fasi di sviluppo.

Le principali analisi svolte dal laboratorio Controllo Qualità su materie prime e prodotti finiti sono: la valutazione dell'aspetto, del colore e dell'odore eseguita mediante controllo visivo e olfattivo per confronto con un contro-campione; la viscosità, la densità, il pH, il colore e la spettrometria Raman con le apposite strumentazioni.

Le analisi svolte sul packaging hanno lo scopo di valutarne l'idoneità. A tal fine vengono condotte delle indagini volte a valutare la compatibilità tra contenitore e prodotto e la funzionalità.

Il Controllo Qualità si occupa inoltre di gestire l'esecuzione di test di sicurezza sulle formule in sviluppo: challenge test, patch test, metalli pesanti, parabeni per tutti i prodotti; test oftalmologici e SPF/UVA dove previsti.

In particolare, il challenge test è richiesto dalla relazione sulla sicurezza del prodotto cosmetico (allegato 1 Regolamento (CE) n.1223/2009 sui prodotti cosmetici, parte A, punto 3, Qualità microbiologica) ed ha lo scopo di determinare l'efficacia e la stabilità del sistema conservante nel tempo. La valutazione del

challenge test è correlata alla stabilità di una formulazione durante la produzione, la conservazione e il suo utilizzo da parte del consumatore (Halla et al., 2018). Esso consiste nella simulazione di un eventuale attacco microbico attraverso l'inoculazione di una quantità misurata di prodotto con quantità note di microrganismi (batteri, lieviti e muffe) per verificare la loro sopravvivenza nel tempo. Il campione viene valutato mediante la conta microbica eseguita su aliquote di prodotto prelevate a intervalli definiti per 28 giorni. Al termine del test, se il prodotto soddisfa il criterio A significa che l'efficacia antimicrobica del preparato è considerata accettabile, in caso contrario sono necessari ulteriori fattori di controllo sul prodotto (G. D'Agostinis, E.Mignini, 2014), (Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, 2008).

Il patch test è eseguito per valutare la tollerabilità dei prodotti e quindi per supportare il claim "dermatologicamente testato". I prodotti cosmetici vengono applicati sulla cute, in condizioni standardizzate, in particolare le sostanze da testare sono utilizzate a concentrazioni tali da non rappresentare un pericolo, ma sufficienti per provocare una reazione. Questo test viene effettuato sotto la supervisione di un medico su almeno 20 volontari al fine di valutare se il cosmetico, in condizione occlusiva per 48 ore sulla cute, provoca la comparsa di fenomeni irritativi.

La ricerca di metalli pesanti, in particolare nichel, cromo, cobalto, mercurio, arsenico e piombo viene eseguita mediante ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) ed ha lo scopo di accertarne la loro presenza al massimo come tracce tecnicamente inevitabili. L'impiego di metalli come ingredienti è esplicitamente vietato dal Regolamento (CE) 1223/2009 che li inserisce nell'allegato II, ovvero nell'elenco delle sostanze il cui uso è vietato nella composizione dei prodotti cosmetici. Tuttavia, in considerazione della loro ubiquitarietà, ne viene tollerata la presenza in piccole quantità, quando sono un residuo del processo di produzione e conservazione del cosmetico o quando presenti come impurezze di altri ingredienti del cosmetico.

La ricerca di parabeni viene condotta mediante LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) con lo scopo di dimostrare l'osservanza dei regolamenti n.358/2014 e n.1004/2014 della Commissione Europea, che hanno messo al bando alcuni parabeni e ne hanno regolamentato l'uso all'interno dei prodotti cosmetici per altri. I parabeni sono largamente impiegati nei cosmetici per le proprietà

conservanti utili a combattere la proliferazione di batteri e muffe e altri microrganismi; la loro azione antibatterica è però oggetto di discussione in quanto ritenuta dannosa per la salute.

Il test oftalmologico è eseguito per i prodotti destinati al contatto con gli occhi, per verificare se il prodotto dà come effetto collaterale irritazione oculare. È un test che si esegue in vivo, su un panel di volontari, sotto controllo di uno specialista in Oftalmologia. Il prodotto viene applicato per 30 giorni durante i quali si monitora la comparsa di un'eventuale irritazione e /o altri effetti avversi.

La determinazione dell'SPF (Sun Protection Factor) consiste in una valutazione preliminare in vitro mediante spettrofotometro, seguita da un'analisi in vivo su volontari, in presenza di un dermatologo. La pelle di questi volontari viene esposta a varie quantità di luce prodotta da simulatori solari, prima e dopo l'applicazione di una quantità ben definita di prodotto per la protezione solare. L'SPF viene valutato attraverso la MED (Dose Minima Eritematogena), che indica la più bassa dose di raggi UV (UltraVioletti) richiesta per produrre nei volontari un arrossamento cutaneo visibile a distanza di 24-26 ore dall'esposizione alle radiazioni ultraviolette. Il rapporto tra la MED su cute protetta e quella su cute non protetta indica il valore numerico del Fattore di Protezione Solare. Viene valutata anche la protezione verso i raggi UVA, con metodica spettrofotometrica. La protezione dai raggi UVA garantita deve essere uguale o superiore a 1/3 della protezione fornita contro i raggi UVB. Pertanto, all'aumentare dell'SPF, dovrà aumentare anche il livello di protezione contro le radiazioni ultraviolette di tipo A.

2.4 TEST DI STABILITÀ

Ogni prodotto cosmetico subisce normalmente variazioni più o meno marcate dovute all'invecchiamento e all'utilizzo dello stesso.

L'obiettivo principale dei test di stabilità è quindi quello di stabilire la durata di conservazione di un prodotto, shelf-life, tempo entro il quale tali variazioni vengono riconosciute accettabili, garantendo che un prodotto cosmetico immesso sul mercato, e conservato in condizioni appropriate, sia conforme agli standard di qualità chimico-fisica e microbiologica e di sicurezza, oltre che mantenere le proprie caratteristiche estetiche e di funzionalità. Definire la stabilità di un prodotto cosmetico, perciò, è un processo molto complesso viste le numerose variabili che

entrano in gioco, ma è di fondamentale importanza per il produttore, perché ad essa sono strettamente correlate l'efficacia e la sicurezza d'uso del cosmetico stesso.

I test di stabilità sui cosmetici comprendono quindi molti aspetti diversi della formulazione di un prodotto e permettono di dimostrare: che il sistema di conservazione è efficiente, che il prodotto è fisicamente stabile e che non interagisce negativamente con l'imballaggio (Kirkbride et al., 2021).

I sistemi di conservazione vengono testati tramite challenge test, e la qualità microbiologica viene ulteriormente confermata svolgendo analisi microbiologiche previste dai protocolli aziendali in specifiche fasi degli studi di stabilità, seguendo le norme ISO per la conta dei batteri vitali mesofili aerobi e di funghi e lieviti.

La stabilità fisica del prodotto viene verificata ponendo i campioni in barattoli di vetro inerte e sottoponendoli a diverse condizioni ambientali.

La stabilità del prodotto nel packaging, quindi l'impatto dell'imballaggio sul prodotto contenuto e gli eventuali effetti che il prodotto potrebbe avere sulla confezione, viene valutata tramite i test di compatibilità, riempiendo con il prodotto l'imballaggio finale e sottoponendolo anche in questo caso a condizioni ambientali diverse. Vengono inoltre eseguiti ulteriori test per valutare la funzionalità dell'imballaggio con il tipo di prodotto.

In generale, esistono diversi motivi per cui un prodotto viene sottoposto ai test di stabilità, inclusa la valutazione di una nuova formulazione di sviluppo, o valutazione di una formulazione con la sua confezione se un metodo o formulazione è stata modificata rispetto all'originale o se il contenitore del prodotto è stato modificato (Kirkbride et al., 2021).

Lo svolgimento dei test di stabilità dei prodotti cosmetici segue le linee guida ICH Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Queste ultime sono state sviluppate per il farmaco, tuttavia mancando linee guida proprie del cosmetico, è prassi comune conformarsi ad esse in quanto per il cosmetico è richiesta garanzia di stabilità e sicurezza equiparabile al farmaco. Tali linee guida forniscono dettagli sulle condizioni di temperatura e umidità alle quali impostare gli studi di stabilità e la frequenza con cui eseguire i controlli. Queste indicazioni sono inoltre predisposte sulla base della zona climatica in cui viene previsto il commercio del prodotto.

I campioni vengono posti in camere climatiche con temperature e umidità differenti e viene osservato il prodotto a queste condizioni per un determinato periodo di tempo (Kirkbride et al., 2021). Nello specifico i campioni coinvolti negli studi di stabilità vengono posti a:

- $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ solitamente utilizzato come campione di controllo;
- $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ definita anche come stabilità a lungo termine (long term);
- $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ definita anche stabilità accelerata.

RH (Relative Humidity) è l'umidità relativa, valore espresso in percentuale, e si riferisce alla quantità d'acqua nell'aria in forma di vapore, comparata alla quantità massima d'acqua che può essere contenuta ad una data temperatura.

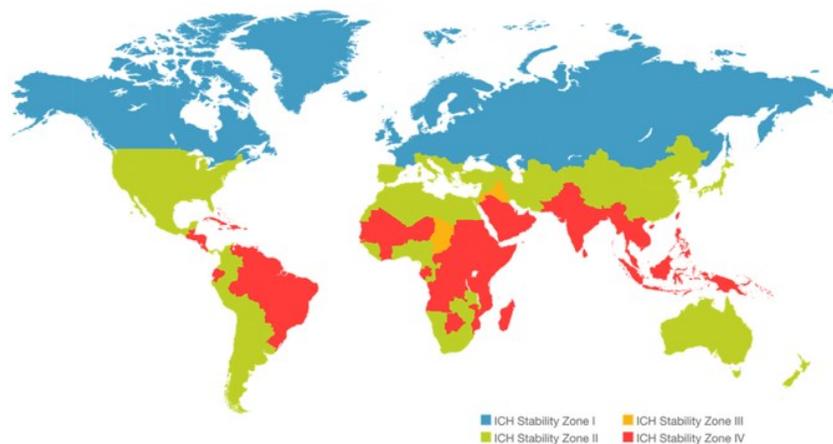


Figura 30 *Illustrazione delle zone climatiche nel Mondo secondo ICH (da www.q1scientific.com/ich-conditions)*

In particolare, le condizioni di temperatura e umidità utilizzate per la stabilità a lungo termine dipendono anche dalla zona climatica in cui l'azienda cosmetica si trova e vende i prodotti cosmetici. Le zone climatiche, come descritto nelle linee guida ICH, sono le quattro zone del mondo che si distinguono per le caratteristiche condizioni climatiche annuali prevalenti. L'Italia, secondo tale linea guida, risulterebbe inserita nella zona climatica II (mediterraneo/subtropicale) (Fig.30), per la quale la condizione di conservazione long term sarebbe $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$. Considerando tuttavia che l'azienda commercia prodotti anche in Paesi appartenenti alla zona climatica III (caldo/secco) e IV (caldo umido/tropicale),

viene utilizzata la condizione relativa a quest'ultima, in quanto più estrema, ovvero $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$. Il prodotto viene mantenuto e osservato a questa condizione per un periodo di tempo superiore rispetto alle altre due, allo scopo di osservare il suo reale andamento nella vita completa a scaffale.

Una caratteristica fondamentale del test di stabilità è quella di fornire, nel minor tempo possibile, informazioni in merito al comportamento di un prodotto nel tempo in cui ci si aspetta che rimanga in uso. Per raggiungere questo risultato, la condizione $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ ha lo scopo di accelerare qualsiasi cambiamento che potrebbe verificarsi normalmente in tempi molto più prolungati, ipotizzando che il meccanismo della reazione non cambi e che la temperatura non sia essa stessa causa di nuovi e inaspettati fenomeni. In tal modo, attraverso l'energia che viene data al sistema con il calore, si vengono a creare alcuni cambiamenti di struttura. Associata alla stabilità accelerata possiamo citare la legge di Arrhenius, che mette in relazione la costante cinetica di una reazione chimica con la temperatura a cui la reazione è condotta: la velocità della reazione raddoppia approssimativamente ogni 10°C di aumento della temperatura.

$$\ln K = \ln A - E_a / RT$$

Dove:

K = costante di velocità

A = fattore di frequenza

E_a = energia di attivazione;

R = costante dei gas;

T = temperatura assoluta (temperatura espressa in Kelvin)

Questa formula però presenta dei limiti e per questo non può essere applicata all'indagine di stabilità del prodotto. La formula, infatti, considera una sola costante di velocità, ovvero una sola reazione, condizione che non si realizza in un prodotto complesso come quello cosmetico e può essere quindi utilizzata solamente nell'indagine di stabilità di singole molecole (Ebrahim et al., 2021).

L'esperienza dimostra che maggiore è il grado di accelerazione che un test tenta di raggiungere, maggiore è il rischio che avvengano cambiamenti avversi nel prodotto che non si verificherebbero mai in condizioni normali ed è importante quindi considerare con attenzione le modifiche eventualmente osservate, per valutare la

stabilità e definire correttamente la shelf-life. Per questo motivo di solito la condizione massima applicata per gli studi di stabilità è $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; al di sopra di 50°C possono intervenire invece fenomeni di destabilizzazione che possono falsare i risultati: si rischia infatti di scartare come instabile un prodotto che non ha superato una prova irrealistica ad alte temperature, quando invece il prodotto è da considerarsi buono e risulta semplicemente troppo sensibile all'intervallo di temperatura scelto. Tuttavia, il test a queste condizioni può essere un buon indicatore iniziale della stabilità di un prodotto, infatti se questo risulta essere ancora stabile a elevata temperatura e umidità, allora si può essere confidenti che sarà molto stabile in condizioni normali (Kirkbride et al., 2021). È necessario dunque saper valutare attentamente i cambiamenti osservati nelle condizioni di stabilità accelerata, in modo da ottenere dei risultati più predittivi possibili. La conferma della predittività degli studi accelerati può avvenire attraverso il confronto con la stabilità chimico-fisica di lotti industriali nel corso dell'intera shelf-life.

Anche i protocolli dei test di compatibilità, svolti dal Controllo Qualità, per escludere l'incompatibilità tra il prodotto e il suo packaging finale, sono basati sulle linee guida ICH. Tuttavia, in questa tesi non costituiscono oggetto diretto di confronto, ma sono complementari allo studio di stabilità trattato e risultano pertanto coinvolti in uno degli scopi del lavoro.

2.5 UNIFARCO

Unifarco è un'azienda fondata nel 1982, ai piedi del Parco delle Dolomiti bellunesi. I soci fondatori, a tutt'oggi ai vertici dell'azienda, da 40 anni sono impegnati a garantire la massima qualità nello sviluppo, produzione e distribuzione alle farmacie di prodotti cosmetici, dermatologici, nutraceutici, dispositivi medici e di make up efficaci, sicuri, accessibili e sostenibili. L'Azienda è custode e interprete di un approccio etico, consapevole e sostenibile, che, insieme alla ricerca, formazione e qualità, sono i pilastri di Unifarco. Tratto distintivo di Unifarco è la possibilità per ciascuna farmacia cliente di personalizzare i prodotti con il proprio marchio. Quanto sopra descritto ha permesso ad Unifarco di raggiungere 366 soci farmacisti in Italia e 5600 farmacie clienti in Europa di cui 2900 in Italia. L'Azienda possiede le seguenti certificazioni di qualità:

- Certificazione ISO 9001

Questo standard di riferimento internazionale stabilisce i criteri per un sistema di gestione della qualità e permette di ottenere un miglioramento continuo delle prestazioni aziendali e della soddisfazione dei clienti.

- Certificazione ISO 14001 Sistema di gestione Ambientale

Norma che tutela la fiducia nella capacità di adempiere la propria politica ambientale e di rispettare le leggi applicabili per limitare l'inquinamento e per migliorare costantemente la propria prestazione.

- Certificazione ISO 45001 Sistema di gestione della Salute e Sicurezza dei Lavoratori

Questo standard si applica con lo scopo di sviluppare e attuare una politica e degli obiettivi che tengano conto delle prescrizioni di legge e delle informazioni disponibili sui rischi per la Salute e Sicurezza dei Lavoratori.

- Certificazione ISO 22716 Pratiche di Buona Fabbricazione (GMP)

Le Buone Pratiche di Fabbricazione, dettate dalla normativa europea, costituiscono lo sviluppo pratico del concetto di assicurazione della qualità e consistono in un insieme di istruzioni pratiche, regole operative e linee guida organizzative specificamente rivolte alla regolamentazione dei fattori umani, tecnici e amministrativi che possono influire sulla qualità del prodotto. L'obiettivo è definire le attività che consentono di ottenere un prodotto che rispecchia caratteristiche definite di qualità e sicurezza. La norma internazionale ISO 22716 descrive le Pratiche di Buona Fabbricazione dei prodotti cosmetici ed il campo di applicazione include le attività di produzione, controllo, conservazione e spedizione.

2.6 IL CONTROLLO QUALITÀ DEI COSMETICI IN UNIFARCO

Il presente progetto di Tesi è stato svolto nel laboratorio di Controllo Qualità, che fa parte dell'area Product Quality Assurance di Unifarco, garante della qualità e della sicurezza del prodotto. Il Controllo Qualità di Unifarco si occupa di controllare tutto ciò che entra in azienda (materie prime, packaging, prodotto finito), gli intermedi di lavorazione (semilavorato) e tutto ciò che viene immesso in commercio (prodotto finito). Il laboratorio Controllo Qualità interviene anche nel

corso dello sviluppo di nuovi progetti svolgendo test di stabilità e compatibilità applicando protocolli aziendali basati sulle linee guida ICH Q1A(R2). Il Controllo Qualità si occupa inoltre di gestire l'esecuzione di test di sicurezza che vengono svolti presso laboratorio esterni sulle formule in sviluppo: challenge test, patch test, ricerca di metalli pesanti, ricerca di parabeni per tutti i prodotti; test oftalmologici e SPF/UVA se previsti. Tutte le attività svolte in laboratorio Controllo Qualità nel corso dell'internato di tesi sono descritte dettagliatamente nel capitolo 4.2.

2.7 LA LINEA DOLOMIA

Questo studio svolto presso Unifarco si è concentrato sull'analisi di una serie di prodotti appartenenti a una specifica linea cosmetica, Dolomia. Dolomia nasce dalla passione e lo studio di piante medicinali dolomitiche, per formulare rimedi cosmetici con fiori e piante del territorio con l'obiettivo di portare sulla pelle delle persone la bellezza e il potere benefico della natura. Ogni prodotto è studiato per produrre un'esperienza di benessere a partire dall'utilizzo di materie prime che racchiudono l'essenza delle Dolomiti, come la sua materia ricca di minerali di origine organica, presenti anche nelle acque e nelle piante che crescono ad alta quota. Il laboratorio di Ricerca e Sviluppo porta avanti la ricerca fitocosmetica innovativa e sostenibile, studiando i principi attivi di derivazione dolomitica che svolgono la loro azione grazie agli ingredienti naturali combinati in modo sinergico, esclusivo ed efficace. I prodotti veicolano la purezza, resilienza e il potere rivitalizzante tipiche degli elementi naturali che hanno origine nel cuore delle Dolomiti attraverso texture gratificanti e fragranze che ne rievocano i profumi. La filosofia formulativa prevede l'utilizzo di ingredienti naturali e adatti anche alle pelli più sensibili; la linea di skincare Dolomia, infatti, è priva di siliconi, parabeni ed oli minerali. Oltre alla pelle rispetta anche l'ambiente, in quanto monitora costantemente l'impatto dei propri prodotti sulla natura grazie all'utilizzo di materie prime locali e pack ecologici.

Le piante dalle potenti proprietà cosmetiche sono rare e vengono utilizzate senza intaccarne la biodiversità grazie alla coltura meristemica. Essa consiste nell'uso di piccolissime porzioni di pianta dalle quali si riesce ad ottenere un estratto partendo da una coltura in vitro che permette la rigenerazione di una nuova pianta con lo stesso profilo morfologico e fitochimico. Dolomia con i suoi estratti della

natura dolomitica agisce per contrastare stress, inquinamento e invecchiamento cutaneo.

3 SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo generale di questo lavoro di tesi è stato quello di effettuare studi di stabilità su una linea di cosmetici sviluppata dall'Azienda Unifarco, la linea cosmetica Dolomia, al fine di validare la loro predittività nei confronti della shelf-life reale dei prodotti. L'interesse nei confronti di questa particolare linea di cosmetici deriva dal fatto che si tratta di prodotti accomunati dall'utilizzo di ingredienti naturali derivati da fiori e piante del territorio.

Nel corso del progetto, sono stati presi in considerazione ed analizzati i principali parametri caratterizzanti il prodotto cosmetico (aspetto, colore, odore, pH, viscosità, stabilità microbiologica), nel corso delle fasi di sviluppo, coinvolgendo prodotti sia con formulazione storica, sia sviluppati più recentemente.

Più nello specifico, in questo lavoro di Tesi ci siamo posti i seguenti scopi:

1) VALUTAZIONE DELL' EFFICACIA PREDITTIVA DEGLI STUDI DI STABILITÀ. L'obiettivo era valutare e confermare l'efficacia degli studi di stabilità svolti nelle fasi di pre-pilota e pilota nel predire la stabilità reale del prodotto industriale durante la sua vita di scaffale (shelf-life).

A tal fine sono stati in primo luogo raccolti i dati relativi alla stabilità dei cosmetici oggetto di studio ottenuti secondo protocollo aziendale applicato a diverse condizioni di temperatura e umidità, indagando e confrontando i principali parametri organolettici e chimico-fisici caratterizzanti il prodotto cosmetico (aspetto, colore, odore, pH, viscosità, stabilità microbiologica), seguendo il prodotto nello sviluppo dalle fasi pre-pilota, pilota fino ai primi lotti industriali (dove presenti). Nel caso dei lotti industriali sono state inoltre integrate informazioni ottenute dalle analisi di lotti a magazzino, i quali sono mantenuti a temperatura ambiente, quindi riconducibili ad una condizione di stabilità a lungo termine ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% di umidità relativa $\text{RH} \pm 5\% \text{RH}$).

Successivamente sono stati considerati due tipi di confronti: da un lato è stato valutato l'andamento e le variazioni dei parametri osservati negli studi di stabilità svolti nelle fasi pre-pilota, pilota e primo lotto industriale dello sviluppo del prodotto cosmetico, confrontandoli alla condizione definita a lungo termine ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% $\text{RH} \pm 5\% \text{RH}$) per la quale l'analisi della stabilità viene seguita per tempi prolungati, anche fino a scadenza del prodotto. Parallelamente, è stato

impostato il confronto tra l'andamento della formula in fase pilota alla condizione di stabilità accelerata, ovvero di elevate temperature e umidità ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$), che ha lo scopo di accelerare eventuali cambiamenti del prodotto, ed i risultati della stabilità a lungo termine ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$), integrata dove necessario con i dati raccolti da analisi su lotti industriali conservati in magazzino.

2) CONFRONTO TRA LA STABILITÀ DEI PRODOTTI FINITI E DELLE MATERIE PRIME IN ESSI CONTENUTE. L'obiettivo di questa parte del lavoro era indagare una possibile correlazione tra i risultati degli studi di stabilità sui prodotti oggetto di studio e su alcune delle materie prime in essi contenute. Si intendeva dimostrare che le variazioni, principalmente di tipo organolettico, registrate sul prodotto finito, erano dovute alle materie prime, in quanto venivano anche sulle stesse evidenziate. A tale scopo solo per alcuni prodotti oggetto di studio, è stato impostato uno studio di stabilità su alcune materie prime presenti in formula; in particolare sono stati selezionati i principali estratti naturali, i profumi ed il colorante, per le formule in cui era presente. Le materie prime sono state analizzate tal quali e, nel caso delle formulazioni con colorante, si è valutato anche il confronto con una soluzione composta dal mix di quelle presenti in formula, opportunamente ponderato. Le valutazioni di confronto tra i prodotti e le materie prime sono state eseguite in particolare sui test condotti in condizioni di stabilità accelerata, con temperatura ed umidità elevate ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$) allo scopo di incentivare l'emersione di eventuali cambiamenti.

3) VALUTAZIONE DELL' EFFICACIA PREDITTIVA DEL CHALLENGE TEST. Il challenge test, svolto presso laboratori esterni, consiste nella contaminazione artificiale del prodotto cosmetico, mediante inoculo di quantità note di microrganismi, seguita da una successiva valutazione della diminuzione della contaminazione stessa, al fine di valutare l'efficacia protettiva del sistema conservante nei confronti del prodotto cosmetico. L'obiettivo consisteva nel confermare la predittività di tale test nella valutazione dell'efficacia del sistema conservante durante l'intera shelf-life del prodotto. Per validare l'ipotesi oggetto di studio è stata svolta internamente l'analisi microbiologica su uno o più lotti industriali, con shelf-life residue diverse, per dimostrare la qualità microbiologica del prodotto. L'analisi consisteva nell'applicare i protocolli di ricerca e conta di

batteri mesofili aerobi (ISO 21149) e lieviti e muffe (ISO 16212) per i campioni prelevati (1 g o 1 ml) dai prodotti, anche scaduti, allo scopo di dimostrare l'assenza di contaminazione, sinonimo di efficacia del sistema conservante per l'intera vita di un prodotto. Per le formulazioni cosmetiche più recenti, per le quali non erano disponibili lotti a fine vita, è stato sfidato ulteriormente il sistema conservante con un test in uso. Quest'ultimo è consistito in un'analisi microbiologica preliminare del prodotto cosmetico, svolta seguendo le norme ISO sopra indicate. Successivamente i cosmetici coinvolti sono stati utilizzati giornalmente in laboratorio simulando le condizioni di un eventuale uso domestico, per un periodo di un mese; al termine è stata svolta una seconda analisi allo scopo di verificare l'efficienza del sistema conservante.

4) PROPOSTA DI OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI AZIENDALI. Scopo di questa parte del lavoro di Tesi, sulla base dei risultati ottenuti è stata quella di valutare una possibile integrazione dei protocolli di stabilità e compatibilità per le fasi di pre-pilota e pilota con un protocollo di analisi combinato. Alla luce dei risultati di questa tesi si intendeva valutare ed elaborare una proposta di ottimizzazione dei protocolli analitici nel corso dello sviluppo di nuove formule, con l'obiettivo da un lato di ottimizzare risorse, spazi, tempi e materiali e dall'altro di ottenere informazioni funzionali sulla stabilità in una fase precoce di scale-up, mantenendo inalterata l'efficacia predittiva degli studi di stabilità e compatibilità e non alterando i tempi del processo di sviluppo del prodotto. A questo fine è stato considerato nello specifico il confronto tra gli andamenti in stabilità dei parametri organolettici e chimico-fisici tra la fase di sviluppo pre-pilota e pilota alla condizione a lungo termine ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$), in quanto maggiormente rappresentativa delle condizioni reali. È emersa una tendenza comune di anticipazione delle variazioni dal punto di vista qualitativo e quantitativo nella fase di pre-pilota, suggerendo la possibilità di avanzare la proposta di integrazione dei protocolli aziendali.

4 MATERIALI E METODI

In questo capitolo sono presentati i materiali e le metodiche impiegati per l'analisi chimico fisica e microbiologica delle formulazioni cosmetiche negli studi di stabilità svolti in questo lavoro di Tesi.

4.1 MATERIALI

4.1.1 ANALISI CHIMICO-FISICHE

Per le analisi della stabilità eseguite seguendo le linee guida ICH Q1A(R2) sono stati utilizzati:

-Misuratore di pH (Fig. 31)

Lo strumento utilizzato è PH METRO SEVEN COMPACT TM S210 (Mettler Toledo). Il campo di misurazione va da 0 a 14 unità di pH. La precisione di misura è ± 0.002 unità di pH. La taratura dello strumento viene effettuata periodicamente utilizzando soluzioni tampone di verifica a pH 2, pH 4.01 e pH 7 a 25°C ed è considerata accettabile solo se il valore di slope, valore dato dalla differenza di mV misurati tra le due soluzioni a valore noto, ottenuto dallo strumento è compreso tra 95 % – 103 %. Le soluzioni vanno conservate nelle migliori condizioni e non oltre la data di scadenza; le aliquote giornaliere utilizzate sono scartate dopo la taratura. Dopo ogni uso l'elettrodo deve essere pulito con acqua distillata (Bonadonna L et al., 2013).

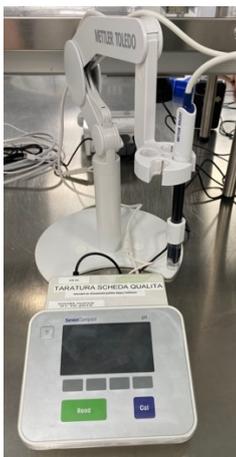


Figura 31 pH-metro Mettler Toledo

-Viscosimetro (Fig. 32)

La determinazione della viscosità viene effettuata con un “Brookfield viscometer” modello Digitale DV-I PRIME, che ha disposizione due kit di giranti: standard RV (regular viscosity) dalla 1 alla 7; HELIPATH dalla A alla F. Le diverse tipologie di giranti permettono di analizzare formulazioni più o meno viscosi. Le velocità utilizzabili sono 18 e vanno dai 0,3 ai 100 RPM, mentre il campo di viscosità rilevabile va dai 100 centiPoise (cP) ai 13 milioni cP. Ai fini di questo lavoro di tesi le giranti utilizzate con la velocità di 10 RPM sono state: RV2, RV3, RV4, RV5, RV6, RV7, T-C.



Figura 32 Viscosimetro Brookfield

-Colorimetro (Fig. 33)

Il colorimetro utilizzato è un Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta). Ha un'area di misurazione di 8 mm, è adatto per la misurazione di colori assoluti e la differenza di colore. Questo strumento rende possibile la precisa quantificazione dei colori e li esprime numericamente secondo degli standard internazionali. I valori numerici per l'elemento da misurare sono identificati usando gli spazi di colore: sono metodi per esprimere il colore di un oggetto o una sorgente luminosa. Il modello utilizzato nell'analisi dei prodotti cosmetici oggetto di studio è lo spazio di colore $L^*a^*b^*$. L^* indica la luminosità mentre a^* e b^* le coordinate di cromaticità, ovvero indicano le direzioni del colore: $+a^*$ è la direzione del rosso, $-a^*$ è la direzione del verde, $+b^*$ è la direzione del giallo e $-b^*$ è la direzione del blu, il centro è acromatico.

Il colorimetro viene utilizzato con lo scopo di identificare le differenze cromatiche tra i prodotti che contengono il colorante. I valori target inseriti sono quelli ottenuti al tempo zero della prova pilota, e nei punti di controllo successivi viene misurata

la differenza tra i vari parametri $L^*a^*b^*$ che lo strumento esprime tramite il valore ΔE .



Figura 33 Colorimetro Konika Minolta

-Camere climatiche (Fig. 34)

Attrezzatura utilizzata per l'incubazione dei campioni analizzati per sottoporli a stress termico e di umidità nel corso della stabilità. Questi apparecchi devono garantire il mantenimento della temperatura di incubazione e il livello di umidità previsti dal metodo analitico e assicurare nei vari scomparti una temperatura costante (Bonadonna L et al., 2013). Il materiale posto ad incubare viene disposto in modo da consentire la circolazione del calore e non deve essere eccessivamente ammassato. Le camere termostatiche utilizzate sono impostate come segue:

$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% Umidità Relativa (RH) $\pm 5\%$ RH

$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 25% RH $\pm 5\%$ RH

$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% RH $\pm 5\%$ RH



Figura 34 Camera climatica per studi di stabilità
-Frigorifero

Attrezzatura utilizzata per l'incubazione dei campioni alla condizione dei $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ prevista dagli studi di stabilità.

4.1.2 ANALISI MICROBIOLOGICHE

Per le analisi eseguite mediante tecnica di conta in piastra per inclusione (paragrafo 4.2.2.1) seguendo le ISO 21148, 21149 e 16212 sono stati impiegati i seguenti:

a) Strumenti

- Autoclave;
- Cappa chimica a flusso laminare dotata di lampada germicida UV (Fig. 35);
- Incubatore a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ e a $25^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ (Fig. 36);
- Bagno d'acqua a temperatura compresa tra i 42°C e i 48°C ;
- Agitatore meccanico (vortex).



Figura 35 Cappa chimica



Figura 36 Incubatore a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ con piastre

b) Diluenti e terreni di coltura:

- Diluente neutralizzante l'attività antimicrobica dei conservanti LPT Dilution Broth con addizionato il Tween® 80;
- Terreno di coltura TSA (Tryptic Soy Agar) per batteri;
- Terreno di coltura SDA (Sabouraud Dextrose Agar con 50 mg di Cloramfenicolo) per lieviti e muffe;

c) Attrezzature:

- Piastre Petri sterili in plastica;
- Pipetta automatica;
- Puntali sterili;
- Provette sterili;
- Anse in plastica sterili.

4.2 METODI

4.2.1 ANALISI DELLA STABILITÀ

Gli studi di stabilità svolti nel laboratorio di Controllo Qualità sono condotti applicando protocolli interni stilati seguendo le linee guida ICH. In particolare, ci si riferisce alla Q1A(R2) che fornisce direttive sulle condizioni e tempistiche del test e sulle specifiche da considerare nel corso della stabilità.

La linea guida riporta che un prodotto dovrebbe essere valutato in condizioni di conservazione che ne verifichino la stabilità termica e, se applicabile, la sua

sensibilità all'umidità. Le condizioni di conservazione e la durata degli studi scelti dovrebbero essere sufficienti per coprire la conservazione, la spedizione e il successivo utilizzo. Secondo la linea guida, gli studi di stabilità dovrebbero includere nel test gli attributi del prodotto che sono suscettibili di modifica durante la conservazione e che possono influenzare la qualità, la sicurezza e/o l'efficacia. Il test dovrebbe coprire pertanto gli attributi fisici, chimici, biologici e microbiologici e i test di funzionalità (linea guida ICH Q1A(R2)).

I protocolli previsti si dividono a seconda dello scopo in: studio di stabilità e studio di compatibilità.

- STUDI DI STABILITÀ

Attraverso tali studi si valuta la stabilità intrinseca del prodotto ponendolo in contenitore inerte (vetro), che non interagisce con il prodotto e che lo protegge dalle influenze dell'ambiente esterno. Il protocollo aziendale prevede di seguire la stabilità del prodotto anche nel suo packaging di destinazione.

Come riportato in tabella 1 le condizioni di temperatura e umidità per le stabilità della fase di sviluppo pilota sono le seguenti:

- $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75 RH \pm 5% RH per 6 mesi

- $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65 RH \pm 5% RH fino alla shelf-life definita per la formula

- $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ per 6 mesi

Quest'ultima condizione viene condotta su indicazione del laboratorio Ricerca e Sviluppo, se si ritiene che ci siano delle potenziali criticità che potrebbero presentarsi solo a basse temperature (esempio formazione di aghi o precipitati), o se si ritiene che la stabilità a 5°C possa servire da confronto per alcune caratteristiche come il colore.

Le frequenze ed i tipi di controllo previsti per ciascuna condizione sono riportati in tabella 1 e 2 secondo le seguenti modalità:

- x=analisi prevista
- casella vuota=analisi non prevista

	Condizioni	Punti di controllo	Organolettica	pH	Viscosità	Analisi microbiologica	Colorimetro	Densità	Pack	
FASE PILOTA	Tempo Zero	0m	X	X	X	X	X	X	X	
	40°C±2°C, 75±5% RH	1m	X							X
		3m	X	X	X					X
		6m	X	X	X					X
		scadenza prodotto	X	X	X	X				X
	30°C±2°C, 65 RH ±5% RH	1m	X							X
		3m	X	X	X	X	X	X		X
		6m	X	X	X	X				X
		12m	X	X	X	X				X
		24m	X	X	X	X				X
		36m	X	X	X	X				X
		scadenza prodotto	X	X	X	X	X			X
	5°C±3°C	1m		X						X
		3m		X	X	X				X
		6m		X	X	X				X

Tabella 1 Condizioni e controlli dello studio di stabilità in fase pilota

	Condizioni	Punti di controllo	Organolettica	pH	Viscosità	Pack
PRIMA PRODUZIONE INDUSTRIALE	Tempo zero	0m	X	X	X	X
	30°C±2°C, 65 RH ±5% RH	6m	X	X	X	X
		12m	X	X	X	X
		24m	X	X	X	X
		36m	X	X	X	X
		scadenza prodotto	X	X	X	X

Tabella 2 Condizioni e controlli dello studio di stabilità della fase industriale

I parametri chimico-fisici e microbiologici di riferimento, rispetto ai quali si registrano le variazioni nei punti di controllo successivi, sono quelli rilevati dal laboratorio Controllo Qualità al momento del primo collaudo al tempo zero. Il Controllo Qualità definisce per ciascun parametro degli intervalli di accettabilità, in collaborazione con il laboratorio di Ricerca e Sviluppo.

Gli aspetti esaminati, seguendo i protocolli, ai vari punti di controllo sono:

- caratteristiche organolettiche: aspetto, colore, odore vengono attribuite in modo soggettivo e non sono espresse in termini numerici. I risultati della variazione organolettica vengono pertanto espressi su scale di valore empiriche. La variazione di colore sui prodotti colorati viene eseguita anche con colorimetro per ottenere un dato oggettivo;

- pH: analisi condotta con pH-metro. Il range di accettabilità è nella maggior parte dei casi di 0.5, ma è inoltre definito all'interno del range di azione del sistema conservante, e di compatibilità con i polimeri presenti nella formulazione ed il pH cutaneo;
- viscosità: analisi fisica condotta tramite viscosimetro. I risultati sono confrontati con l'intervallo di accettabilità definito al collaudo, considerando normalmente uno scostamento del $\pm 20\%$ dal valore iniziale;
- analisi microbiologica: svolta secondo il metodo esposto nei paragrafi successivi;
- colorimetro: test condotto con l'utilizzo dello strumento colorimetro per i prodotti contenenti colorante. Al tempo zero si definiscono i valori target dei parametri L, a, b, utilizzati nei punti di controllo successivi. Il risultato è accettabile se il valore di ΔE ottenuto è inferiore a 3. Infatti, secondo questo metodo, entro la differenza $\Delta E1$ i colori sono apparentemente uguali, entro la differenza $\Delta E3$ i colori non sono significativamente diversi, mentre oltre la differenza $\Delta E5$ i colori sono decisamente diversi.
- pack: consiste in un controllo funzionale del prodotto con il suo packaging, ovvero rilevare se nel tempo ci siano delle interazioni anomale che portano a delle modifiche del prodotto o del contenitore. Ai vari punti di controllo viene eseguita una valutazione visiva del prodotto, per escludere anomalie di tipo organolettico ed inoltre vengono eseguite delle prove di funzionalità che si differenziano a seconda della tipologia di contenitore. Per i vasi si valuta il corretto accoppiamento tra vaso e tappo mediante prove di avvvitamento e svitamento; per i falconi con tappo si valuta il corretto accoppiamento tra tappo e flacone nel caso dei tappi a vite e si eseguono prove di avvvitamento e svitamento; mentre nel caso dei tappi filp top si eseguono prove di apertura e chiusura; per i falconi con pompa si valuta la corretta erogazione mediante prove di pompaggio; per gli airless si valuta la corretta erogazione mediante prove di estrusione ed infine per i tubi si valuta

la corretta tenuta dei tappi mediante prove di avvitamento e svitamento nel caso dei tappi a vite, o di apertura e chiusura nel caso dei tappi flip top.

Oltre alle rilevazioni interne vengono svolti dei test di sicurezza presso i laboratori esterni quali: challenge test, patch test, ricerca di metalli pesanti e parabeni.

Al termine dei tre mesi di studio di stabilità accelerata condotta alle condizioni di elevate temperature ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidità ($75 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$) al fine di accelerare le modifiche nella formulazione, se si ritiene che i parametri osservati siano conformi, la formula viene approvata dal responsabile dell'area Product Quality Assurance, e si può quindi procedere con la prima produzione industriale. Normalmente si assegna in primo momento una validità cautelativa di 36 mesi, per poi eseguire una rivalutazione e un allungamento dopo ulteriori 3 mesi. Nei casi dubbi si rimanda la decisione dopo la valutazione della stabilità del primo lotto industriale a 12 mesi. I prodotti Dolomia oggetto di studio hanno una validità di 48 mesi.

Per i “cosmetici storici” oggetto di studio i protocolli di stabilità di riferimento differiscono da quelli sopra esposti per la mancanza del controllo alla condizione dei $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, aspetto che è stato implementato successivamente. Viene riportata la tabella di riferimento (tabella 3) per le condizioni e le tempistiche seguite in tali studi.

	Condizioni	Punti di controllo	Organolettica	pH	Viscosità	Analisi microbiologica	Colorimetro	Densità	Pack
FASE PILOTA	Tempo Zero	0m	X	X	X	X	X	X	X
	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\% \text{ RH}$	1m	X						X
		3m	X	X	X				X
		6m	X	X	X				X
		scadenza prodotto	X	X	X	X			X
	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$	1m	X						X
		3m	X	X	X	X	X	X	X
		6m	X	X	X				X
		12m	X	X	X				X
		24m	X	X	X				X
		36m	X	X	X				X
		scadenza prodotto	X	X	X	X	X		X

Tabella 3 Condizioni e controlli dello studio di stabilità in fase pilota con protocollo precedente

Gli studi di stabilità hanno coinvolto anche le materie prime oggetto di questo studio. Queste sono state inserite tal quali all'interno di tre contenitori in vetro o plastica, uno per ciascuna condizione di analisi ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$; $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$; $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$). Per alcune è stata predisposta una soluzione che conteneva più materie prime presenti in una formula cosmetica con colorante.

La soluzione è stata preparata secondo la seguente modalità: è stata preliminarmente individuata la percentuale di materia prima presente nel prodotto finito, ricavata dalla formula. Successivamente si è proceduto con la preparazione della soluzione di acqua e alcol etilico denaturo al 5%v/v, in cui disperdere le materie prime. L'alcol etilico ha avuto la funzione di prevenire l'inquinamento microbiologico in quanto gli esperimenti sono stati svolti in assenza di conservanti. È stato preparato 1 L di mezzo di dispersione utilizzando 950 ml di acqua e 50 ml di alcol etilico denaturato. Il colorante è stato inserito nella percentuale prevista in formula previa preparazione di una soluzione 10 volte più concentrata, per comodità tecnica. In un vasetto sono state inserite le materie prime alle quantità (ml o g) opportune ed è stato portato a volume di 100 ml utilizzando la soluzione di acqua e alcol etilico denaturato. Per permettere una corretta dispersione la soluzione è stata miscelata con una bacchetta di vetro. In totale sono stati predisposti 3 vasetti, uno per temperatura di stabilità.

- STUDI DI COMPATIBILITÀ

Queste analisi valutano la compatibilità contenitore-prodotto e vengono svolte ponendo sia il packaging vuoto sia riempito con il prodotto a quattro diverse condizioni:

-40°C ± 2°C, 25 RH ± 5% RH

- 40°C ± 2°C, 75 RH ± 5% RH

- 30°C ± 2°C, 65 RH ± 5% RH

- 5°C ± 3°C

Gli studi prevedono una frequenza dei controlli a 2, 4, 8, 12 settimane e per la condizione dei 40°C ± 2°C, 25 RH ± 5% RH fino a 52 settimane.

I parametri analizzati indagano le alterazioni relative al packaging, alla sua funzionalità, e all'interazione con il prodotto, compreso l'aspetto organolettico del prodotto erogato.

4.2.2 ANALISI MICROBIOLOGICHE

4.2.2.1 METODO DI CONTA IN PIASTRA

Il metodo di analisi microbiologica utilizzato in questo lavoro di Tesi è la tecnica della "conta in piastra per inclusione" applicata a batteri, lieviti e muffe. Il

laboratorio di Microbiologia presente all'interno dell'azienda Unifarco S.p.A. è stato progettato e allestito in conformità alla normativa europea ISO 21148:2017.

- Ricerca di batteri. Dal punto di vista dei batteri, vengono presi in considerazione quelli mesofili aerobi. Si tratta di batteri che crescono in presenza di ossigeno a temperature tra i 20°C e i 45°C. Il conteggio di batteri vitali mesofili aerobi su agar è un parametro che permette di rilevare un gruppo eterogeneo di microrganismi aerobi vivi, che hanno differenti capacità metaboliche e richieste nutrizionali. Generalmente tra questi microrganismi sono rilevate specie ambientali o saprofiti. Per la conta e ricerca di tali batteri (mesofili aerobi) si segue la normativa europea ISO 21149:2017 e il parametro ottenuto fornisce indicazioni sulla qualità microbiologica generale del prodotto cosmetico. Secondo le raccomandazioni del Cosmetics Europe e le linee guida dell'SCCS, le concentrazioni dei batteri vitali mesofili aerobi non devono superare le 1000 UFC/g o mL per i prodotti ad uso generale, mentre per i prodotti usati per i bambini e nell'area periorbitale, il limite è di 100 UFC/g o mL (Bonadonna L et al., 2013). Il limite imposto dai protocolli aziendali per tutti i prodotti oggetto di questo studio è 20 UFC/g. Nello specifico il metodo applicato, indicato dalla normativa ISO 21149, prevede la conta delle colonie su un terreno agarizzato non selettivo. La possibile inibizione della crescita microbica dal campione deve essere neutralizzata per consentire la ricerca di microrganismi vitali, pertanto viene inibita l'attività di eventuali conservanti presenti nel cosmetico come sotto descritto.

La conta in piastra è costituita dalle seguenti fasi:

- 1) Preparazione delle piastre mediante inclusione in piastra utilizzando opportuni terreni di coltura sotto descritti e inoculo delle piastre utilizzando una quantità definita della diluizione del prodotto;
- 2) Incubazione aerobica, ovvero in presenza di ossigeno, delle piastre all'interno di incubatori impostati alla temperatura di $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ per $72\text{h} \pm 6\text{h}$ specificata nella norma;
- 3) Conta del numero di unità formanti colonia (UFC) e calcolo del numero di batteri per millilitro o grammo di prodotto.

Nello specifico, nella prima fase si preparano il diluente neutralizzante e il terreno di coltura. Il diluente neutralizzante utilizzato per disperdere i campioni è l'LPT

Dilution Broth fornito dall'azienda Biolife Italiana S.r.l. (Lecitina 3.0 g/L; Sodio tiosolfato 5.0 g/L; Idrolisato triptico di caseina 1.0 g/L; Sodio cloruro 8.5 g/L; Sodio fosfato bibasico 8.0 g/L; Potassio fosfato monobasico 1.5 g/L; L-istidina HCl 1.0 g/L) addizionato con Polisorbato 80 (Tween® 80). Tale diluente così costituito contiene tutti i componenti utili per il recupero dei microrganismi e per la neutralizzazione delle sostanze antimicrobiche. Il Tween® 80 in particolare svolge sia l'azione di neutralizzante, sia diminuisce la tensione superficiale all'interfaccia batterio-liquido di coltura, permettendo una più rapida penetrazione dei composti nutritivi nella cellula e incrementando così il tasso di crescita. Tale diluente neutralizzante è perciò ritenuto idoneo alla preparazione della soluzione iniziale di campione. Si prepara sospendendo 28 g di polvere LPT Dilution Broth in 1000 ml di acqua distillata fredda, scaldando per sciogliere completamente il terreno e addizionando 30 ml di Tween® 80. Si porta ad ebollizione miscelando per 5 minuti. Il diluente viene poi posto in un recipiente idoneo e sterilizzato in autoclave a 121°C per 15min. Dopo la sterilizzazione, quando il terreno è ancora caldo viene mescolato bene e una volta raggiunta la temperatura ambiente viene controllato il pH, il quale deve essere pari a 7.0 ± 0.2 .

Per testare l'efficacia del terreno di coltura e per verificare che il diluente abbatta il conservante, ma non i microrganismi, viene effettuato un controllo positivo. Secondo la ISO questo consiste in un inoculo costituito da ceppi rappresentativi di microrganismi Gram negativi (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC (American Tissue Cultures Collection) 9027), e Gram positivi (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) che possono essere presenti nel campione oggetto di studio. Tuttavia, per comodità di gestione, negli anni è stato validato internamente un controllo positivo costituito dal batterio Gram + *Bacillus Coagulans* (ATCC PTA-6086).

Il terreno di coltura utilizzato per la conta è il TSA, Tryptic Soy Agar (digerito pancreatico di caseina, peptone di soia, sodio cloruro e agar). È un terreno in polvere fornito dall'azienda Biolife Italiana S.r.l e si prepara sciogliendo 40 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda e portando ad ebollizione miscelando per 5 minuti, poi si trasferisce in idonei contenitori per la sterilizzazione in autoclave a 121°C per 15 minuti. Dopo la sterilizzazione e il raffreddamento il pH deve essere equivalente a 7.3 ± 0.2 quando misurato a temperatura ambiente.

A questo punto si può procedere con la preparazione del campione. Un ml di campione (materia prima, semilavorato o prodotto finito) viene diluito da 9 ml di diluente neutralizzante sopra descritto (LPT Dilution Broth addizionato con Tween® 80). Si ottiene così una sospensione iniziale, o primaria, diluita 1:10, la quale viene omogeneizzata mediante agitazione con vortex. Il tempo trascorso tra la fine della preparazione della sospensione iniziale e il momento in cui l'inoculo viene a contatto con il terreno di coltura non deve superare i 45 minuti. Il passaggio successivo è l'inoculo per inclusione: dalla sospensione iniziale viene prelevato 1 ml e messo in una piastra Petri, alla quale vengono aggiunti da 15 a 20 ml del terreno di crescita per batteri TSA fuso, mantenuto in un bagnetto d'acqua termostato a temperatura non superiore a 48°C. Infine il terreno fuso e l'inoculo vengono miscelati ruotando la piastra in modo da ottenere una dispersione omogenea del volume del campione all'interno della massa del terreno e viene lasciata solidificare la miscela nelle piastre Petri su un piano orizzontale a temperatura ambiente. Si capovolgono quindi le piastre inoculate e si esegue un'incubazione come descritto al punto 2.

- Ricerca di funghi e lieviti. La conta di lieviti e muffe segue la normativa europea ISO 16212:2017. Questo metodo consente la crescita e il conteggio delle colonie sviluppate su un terreno selettivo agarizzato. La possibile inibizione della crescita microbica dal campione deve essere neutralizzata per permettere di rilevare i microrganismi vitali. Viene per questo inibita l'attività del conservante.

La conta in piastra è costituita dalle seguenti fasi:

- 1) Preparazione delle piastre tramite inclusione in piastra utilizzando un terreno di coltura specifico e inoculo delle piastre utilizzando una quantità definita della diluizione del prodotto;
- 2) Incubazione aerobica delle piastre a $25^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ per 5 giorni;
- 3) Conta del numero di unità formanti colonia (UFC) di lieviti e muffe per millilitro o grammo di prodotto.

Il metodo segue la stessa procedura e utilizza lo stesso diluente neutralizzante descritti per la conta dei batteri, le uniche differenze riguardano il terreno di crescita impiegato e la temperatura ed il tempo dell'incubazione. Il terreno utilizzato nel caso di lieviti e muffe è il Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar addizionato

di Cloramfenicolo allo 0,005% (digerito pancreatico di caseina, digerito peptico di carne, glucosio, agar, cloramfenicolo). È un terreno in polvere fornito dall'azienda Biolife Italiana S.r.l che si prepara sospendendo 65 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda, miscelando e portando ad ebollizione mescolando per 5 minuti. Si distribuisce il terreno in contenitori idonei e si sterilizza in autoclave a 121°C per 15 minuti. Dopo la sterilizzazione una volta raggiunta la temperatura ambiente si misura il pH che deve essere equivalente a 5.6 ± 0.2 . Per testare l'efficacia del terreno di coltura e per verificare che il diluente neutralizzante abbatta il conservante, ma non i microrganismi, viene effettuato un controllo positivo: in questo caso il ceppo di riferimento per l'inoculo secondo ISO è costituito dal lievito *Candida albicans* ATCC 10231 o un ceppo equivalente. Tuttavia, anche in questo caso per comodità di gestione, negli anni è stato validato internamente un controllo positivo costituito dal lievito *S. cerevisiae var. boulardii* (ATCC MYA-796).

Nel corso dell'analisi microbiologica sia per la ricerca di batteri che di lieviti e muffe, il protocollo aziendale prevede la preparazione anche dei seguenti controlli negativi, al fine di verificare l'assenza di contaminazioni durante il processo:

- una piastra con solo terreno di coltura (TSA o SDA);
- una piastra con inculo di 1 ml di diluente neutralizzante con terreno di coltura TSA all'inizio dell'analisi;
- una piastra con inculo di 1 ml di diluente neutralizzante con terreno di coltura TSA al termine dell'analisi;
- una piastra con inculo di 1 ml di diluente neutralizzante con terreno di coltura SDA all'inizio dell'analisi;
- una piastra con inculo di 1 ml di diluente neutralizzante con terreno di coltura SDA al termine dell'analisi.

Conta in piastra delle colonie. Dopo il periodo di incubazione si procede con la conta delle colonie. In genere la conta è eseguita utilizzando almeno 2 piastre Petri per lo stesso campione. Nel campione, inteso come la porzione di prodotto (1 g o 1 ml) utilizzata nella prova per preparare la sospensione iniziale, il numero di microrganismi N presenti è dato dalla seguente equazione:

$$N = c / (V \times d)$$

Dove:

c è il numero delle colonie contate su una singola piastra

V è il volume di inoculo applicato ad ogni piastra, in millilitri

d è il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione eseguita, nel nostro caso per la preparazione della sospensione iniziale, oppure in generale per la prima diluizione contata.

Per una conta precisa si dovrebbe tener conto solo delle piastre con un numero di colonie compreso tra 30 e 300 per i batteri e tra 15 e 150 per i lieviti e funghi.

Nel caso in cui il numero di UFC/g o ml è rispettivamente minore di 30 o 15 sulle piastre, il campione S è almeno 1 g o 1 ml e il volume V di inoculo è almeno 1 ml, il numero stimato di batteri per millilitro o per grammo del campione è uguale a N/S .

Nel caso non si rilevi crescita di colonie nel risultato si indica che il numero di UFC/g o ml è inferiore a

$$1/d \times V \times S$$

Dove d è il fattore di diluizione della sospensione iniziale e V è 1.

4.2.2.2 TEST IN USO

Per “test in uso” si intende un protocollo aziendale che simula il reale utilizzo di un prodotto. Viene applicato allo scopo di: ottenere informazioni più realistiche sull’efficacia e stabilità delle proprietà di conservazione di un prodotto cosmetico nella fase post-produttiva; valutare la stabilità microbiologica di prodotti cosmetici per i quali il challenge test non è attendibile, in quanto non è possibile la miscelazione dei microrganismi presenti in inoculi acquosi, come le emulsioni acqua in olio (G. D’Agostinis, E.Mignini, 2014).

In questo lavoro di tesi il metodo del test in uso è stato eseguito per emulsioni olio in acqua al fine di sfidare il sistema conservante in modo quanto più simile alle reali condizioni d’uso. Il test in uso sul prodotto cosmetico, nella sua presentazione definitiva o contenuto in una confezione quanto più corrispondente alla definitiva, prevede:

- analisi microbiologia, seguendo le norme ISO 21148 e 16212 precedentemente descritte;

- utilizzo secondo le proprie abitudini per un periodo di 4 settimane, ovvero giornalmente prelevando con le dita, se si tratta di prodotti in vaso, o erogando il prodotto, se si tratta di prodotti in flaconi o tubi, quantità di prodotto pari a quelle di un utilizzo personale.

- nuove analisi microbiologiche sui campioni testati al fine di verificarne il contenuto microbico.

L'efficacia del sistema conservante viene considerata accettabile qualora la carica microbica riscontrata risulti conforme ai limiti di accettabilità stabiliti per il prodotto finito e in particolare sia inferiore o uguale a quella inizialmente riscontrata nel campione.

5 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 VALUTAZIONE DELL' EFFICACIA PREDITTIVA DEGLI STUDI DI STABILITÀ

Gli esperimenti svolti avevano l'obiettivo di valutare l'efficacia degli studi di stabilità nel predire la stabilità reale del prodotto industriale durante la shelf-life.

I prodotti analizzati a questo scopo sono stati 17, dei quali: 12 sviluppati più recentemente con studi di stabilità non ancora completamente conclusi; 5 con formulazione storica, le cui analisi di stabilità risultano complete anche di lotti industriali prossimi alla scadenza, e in alcuni casi anche oltre la scadenza. L'elenco INCI (International Nomenclature for Cosmetic Ingredients) dei prodotti è riportato nella tabella 4.

PRODOTTO	COMPOSIZIONE (INCI)
CREMA VISO DETERGENTE (1)	Aqua, Caprylic/Capric triglyceride, Coco-caprylate/Caprato, Neopentyl glycol diheptanoate, Behenyl alcohol, Glyceryl stearate, Pentylene glycol, Glycerin, Corylus avellana nut oil, Propanediol, Peucedanum ostruthium leaf extract, Rosa canina seed extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Cetareth-12, Cetareth-20, Cetearyl alcohol, Cetyl palmitate, Citric acid, Ethylhexylglycerin, Hydrogenated palm glycerides citrate, Laureth-7 citrate, p-Anisic acid, Parfum, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Rosmarinus officinalis leaf extract, Sodium hydroxide, Sodium polyacrylate, Sodium stearyl glutamate, Tocopherol, Trisodium ethylenediamine disuccinate, o-Cymen-5-ol, Potassium sorbate, Sodium benzoate.
CREMA MANI (2)	Aqua, Glycerin, Butyrospermum parkii butter, Caprylic/Capric triglyceride, Polyglyceryl-6 distearate, Pentylene glycol, Corylus avellana nut oil, Neopentyl glycol diheptanoate, Propylheptyl caprylate, Tapioca starch, C10-18 triglycerides, Isononyl isononanoate, Propanediol, Theobroma Cacao Seed Butter, Zymomonas ferment extract, Honey extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Acrylates/Beheneth-25 Methacrylate Copolymer, Caprylyl glycol, Carbomer, Cetearyl alcohol, Cetyl alcohol, Citric acid, Jojoba esters, Maltodextrin, Parfum, Limonene, Linalool, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Polyglyceryl-3 beeswax, o-Cymen-5-ol, Sodium dehydroacetate, Sodium hydroxide, Sodium stearyl glutamate, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Xanthan gum.
CONTORNO OCCHI (3)	Aqua, Glycerin, C10-18 triglycerides, Acacia decurrens/Jojoba/Sunflower seed cera/Polyglyceryl-3 esters, Propylene glycol, Sodium starch octenylsuccinate, Caprylic/Capric triglyceride, Pentaerythrityl tetraisostearate, Hordeum vulgare seed flour, Cetyl alcohol, Dipentaerythrityl pentaizononanoate, Glyceryl stearate, Butyrospermum parkii butter, Pentylene glycol, Neopentyl glycol diheptanoate, Papaver rhoeas extract, Rosa gallica callus lysate, Crocus chrysanthus bulb extract, Crocus sativus flower extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Acacia senegal gum, Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer, Betaine, C9-12 Alkane, Caprylyl caprylate/caprato, Castor oil/IPDI copolymer, Cera alba, Ceteth-20, CI 14700, Citric acid, Coco-caprylate/Caprato, Diinoleic Acid/Butanediol Copolymer, Ethylhexylglycerin, Glyceryl caprylate, Isodecyl neopentanoate, Lactic acid, Lauroyl lysine, o-Cymen-5-ol, PEG-75 stearate, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Polyacrylate crosspolymer-11, Sodium chloride, Sodium hydroxide, Sodium sulfate, Steareth-20, Tocopherol, Triheptanoin, Trisodium ethylenediamine disuccinate.
CREMA VISO ANTIETA' PELLI SECCHHE (4)	Aqua, Glycerin, Coco-caprylate/Caprato, Cetearyl isononanoate, Lauroyl lysine, Neopentyl glycol diheptanoate, Pentaerythrityl tetraisostearate, Propanediol, Hordeum vulgare seed flour, Cetearyl alcohol, Butyrospermum parkii butter, Pentylene glycol, Behenyl alcohol, Coconut/Palm Kernel Alkanes, Rosa gallica callus lysate, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Crocus chrysanthus bulb extract, Crocus sativus flower extract, Acacia decurrens/Jojoba/Sunflower seed cera/Polyglyceryl-3 esters, Acacia senegal gum, Betaine, Candelilla cera, Caprylyl glycol, Castor oil/IPDI copolymer, CI 14700, Citric acid, Diinoleic Acid/Butanediol Copolymer, Ethylhexylglycerin, Glyceryl stearate, Helianthus annuus seed wax, Hydrogenated vegetable oil, Hydroxyethyl acrylate/Sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, Jojoba esters, Lactic acid, Hydroxycitronellal, Alpha-isomethyl ionone, Citronellol, Eugenol, Geraniol, Limonene, Linalool, o-Cymen-5-ol, Olus oil, Parfum, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Polyacrylate crosspolymer-6, Polyglycerin-3, Sodium chloride, Sodium polyacrylate, Sodium stearyl glutamate, Sodium sulfate, t-Butyl alcohol, Triheptanoin, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Xanthan gum.

PRODOTTO	COMPOSIZIONE (INCI)
SIERO VISO (5)	Aqua, Glycerin, Propanediol, Caprylic/Capric triglyceride, Diisopropyl sebacate, Octyldodecanol, Acacia senegal gum, Hordeum vulgare seed flour, Pentylene glycol, Coconut/Palm Kernel Alkanes, Neopentyl glycol diheptanoate, Pentaerythrityl tetraisostearate, Sodium polyacryloyldimethyl taurate, Rosa gallica callus lysate, Tamarindus indica seed polysaccharide, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Crocus chrysanthus bulb extract, Crocus sativus flower extract, Betaine, C10-18 triglycerides, Caprylyl glycol, Castor oil/IPDI copolymer, Cellulose gum, Cetearyl alcohol, CI 14700, Citric acid, Coco-caprylate/Caprates, Dilinoleic Acid/Butanediol Copolymer, Glyceryl stearate, Helianthus annuus seed wax, Jojoba esters, Lactic acid, Hydroxycitronellal, Alpha-isomethyl ionone, Citronellol, Eugenol, Geraniol, Limonene, Linalool, Microcrystalline cellulose, o-Cymen-5-ol, Parfum, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Polyglycerin-3, Sodium anisate, Sodium chloride, Sodium levulinate, Sodium stearyl glutamate, Sodium sulfate, Triheptanoin, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Xanthan gum.
GEL IDRATANTE (6)	Aqua, Propanediol, Pentylene glycol, Glycerin, Methyl gluceth-10, Copper gluconate, Crataegus monogyna flower/leaf extract, Magnesium aspartate, Melissa officinalis flower/leaf/stem extract, Rosa canina fruit extract, Sambucus nigra extract, Scutellaria alpina flower/leaf/stem extract, Sodium hyaluronate, Tamarindus indica seed polysaccharide, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Zinc gluconate, Citric acid, Hydroxyethyl acrylate/Sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, Parfum, PEG-40 hydrogenated castor oil, Potassium sorbate, PPG-26-buteth-26, Sodium anisate, Sodium benzoate, Sodium levulinate, Trisodium ethylenediamine disuccinate.
CREMA VISO IDRATANTE (7)	Aqua, Caprylyl caprylate/caprates, Diisopropyl adipate, Propylene glycol, Alcohol denat., Butylene glycol dicaprylate/Dicaprate, Methylpropanediol, Behenyl alcohol, Pentylene glycol, Arachidyl alcohol, Propylheptyl caprylate, Copper gluconate, Magnesium aspartate, Rhododendron ferrugineum extract, Scutellaria alpina flower/leaf/stem extract, Tamarindus indica seed polysaccharide, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Zinc gluconate, Arachidyl glucoside, Arginine, Capryloyl glycine, Caprylyl glycol, Citric acid, Glycerin, Lauroyl lysine, Parfum, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Polyacrylate crosspolymer-6, Polymethyl methacrylate, Potassium sorbate, o-Cymen-5-ol, Sodium benzoate, Sodium polyacrylate, Sodium stearyl lactylate, Squalane, Synthetic fluorophlogopite, t-Butyl alcohol, Tin oxide, Titanium dioxide, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Undecylenoyl glycine, Xanthan gum.
SIERO ANTI-AGE (8)	Aqua, Glycerin, Neopentyl glycol diheptanoate, Propylene glycol, Pentylene glycol, Cetyl alcohol, Isodecyl neopentanoate, Isononyl isononanoate, Honokiol, Magnolol, Morus alba leaf extract, Picea abies extract, Sclareolide, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Olive oil polyglyceryl-6 esters, Polyglyceryl-6 laurate, Arginine, Cetyl phosphate, Glyceryl caprylate, p-Anisic acid, Parfum, Coumarin, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Polyacrylate crosspolymer-6, Propanediol, o-Cymen-5-ol, t-Butyl alcohol, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Xanthan gum.

PRODOTTO	COMPOSIZIONE (INCI)
CREMA VISO NUTRIENTE (9)	Aqua, Propylheptyl caprylate, Isononyl isononanoate, Squalane, Polymethyl methacrylate, Glycerin, Dipentaerythrityl hexacaprylate/Hexacaprinate, Isopentylidiol, Olus oil, Cetyl alcohol, Glyceryl stearate, Pentaerythrityl distearate, Peucedanum ostruthium leaf extract, Rhododendron ferrugineum extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Rosa canina seed extract, Rosmarinus officinalis leaf extract, Candelilla cera, Capryloyl glycine, Caprylyl glycol, Carbomer, Cellulose gum, Cetearyl alcohol, Ceteth-20, Glyceryl behenate, Glyceryl dibehenate, Hydrogenated palm oil, Hydrogenated rapeseed oil, Hydrogenated vegetable oil, Microcrystalline cellulose, PEG-75 stearate, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Pentylene glycol, Potassium sorbate, Sodium benzoate, o-Cymen-5-ol, Sodium dehydroacetate, Sodium chloride, Sodium hydroxide, Sodium polyacrylate, Parfum, Coumarin, Sodium stearyl lactylate, Sodium sulfate, Steareth-20, Synthetic fluorphlogopite, Tin oxide, Tribehenin, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Citric acid, CI 14700, CI 77891.
CREMA CORPO (10)	Aqua, Propylheptyl caprylate, Isononyl isononanoate, Caprylic/Capric triglyceride, Glycerin, Butyrospermum parkii butter, C10-18 triglycerides, Isopentylidiol, Polymethyl methacrylate, Oleyl erucate, Olus oil, Cocoglycerides, Cetyl alcohol, Glyceryl stearate, Corylus avellana nut oil, Crataegus monogyna flower/leaf extract, Melissa officinalis flower/leaf/stem extract, Rosa canina fruit extract, Rosa canina seed extract, Rosmarinus officinalis leaf extract, Sambucus nigra extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Acacia decurrens/Jojoba/Sunflower seed cera/Polyglyceryl-3 esters, Acrylates/Beheneth-25 Methacrylate Copolymer, Candelilla cera, Capryloyl glycine, Caprylyl glycol, Ceteth-20, CI 14700, CI 77891, Citric acid, Glyceryl behenate, Glyceryl dibehenate, Hydrogenated palm glycerides citrate, Hydrogenated vegetable oil, Lauroyl lysine, o-Cymen-5-ol, Parfum, Coumarin, PEG-75 stearate, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Pentylene glycol, Propanediol, Sodium chloride, Sodium dehydroacetate, Sodium polyacrylate, Sodium stearyl lactylate, Sodium sulfate, Steareth-20, Synthetic fluorphlogopite, Tin oxide, Tocopherol, Tribehenin, Trisodium ethylenediamine disuccinate.
LATTE CORPO (11)	Aqua, Dibutyl adipate, Isononyl isononanoate, Propanediol, Polyglyceryl-6 distearate, Lauroyl lysine, Propylheptyl caprylate, Corylus avellana nut oil, Crataegus monogyna flower/leaf extract, Melissa officinalis flower/leaf/stem extract, Rosa canina fruit extract, Sambucus nigra extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Capryloyl glycine, Caprylyl glycol, Carbomer, Cetyl alcohol, Copper gluconate, Zinc gluconate, Magnesium aspartate, Glycerin, Jojoba esters, Menthyl lactate, Parfum, Coumarin, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Pentylene glycol, Polyglyceryl-3 beeswax, Sodium hydroxide, Sodium stearyl lactylate, Synthetic fluorphlogopite, Tin oxide, Trisodium ethylenediamine disuccinate, o-Cymen-5-ol, Undecylenoyl glycine, Xanthan gum, CI 77891.
CREMA VISO ANTIETA' PELLI SENSIBILI (12)	Aqua, Cetearyl isononanoate, Isononyl isononanoate, Butyrospermum parkii butter, Pentaerythrityl tetraethylhexanoate, Propanediol, Polyglyceryl-6 distearate, Cetyl alcohol, Caprylic/Capric triglyceride, Distarch phosphate, Oleyl erucate, Glycerin, Isodecyl neopentanoate, Acacia decurrens/Jojoba/Sunflower seed cera/Polyglyceryl-3 esters, Pentylene glycol, Isopentylidiol, Hydrogenated palm oil, Hydrogenated rapeseed oil, Maltodextrin, Honey extract, Zymomonas ferment extract, Picea abies extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, N-isopropyl palmitoylamide, C10-18 triglycerides, Calendula officinalis flower extract, Ribes Nigrum Seed Oil, Rubus Idaeus Seed Oil, Capryloyl glycine, Caprylyl glycol, Glyceryl behenate, Glyceryl dibehenate, Jojoba esters, Benzyl salicylate, Limonene, Linalool, o-Cymen-5-ol, Parfum, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Polyacrylate crosspolymer-11, Polyglyceryl-3 beeswax, Sodium hydroxide, Sodium stearyl glutamate, Tamarindus indica seed polysaccharide, Tribehenin, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Undecylenoyl glycine, Xanthan gum.

PRODOTTO	COMPOSIZIONE (INCI)
ACQUA SPRAY (13)	Aqua, Glycerin, Propanediol, Pentylene glycol, Allantoin, Narcissus pseudo-narcissus flower extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Parfum, PEG-40 hydrogenated castor oil, PPG-26-buteth-26, Propylene glycol, PVP, PEG-8, Tocopherol, Ascorbyl Palmitate, Ascorbic Acid, Sodium anisate, Sodium levulinate, Citric acid, Trisodium ethylenediamine disuccinate.
CREMA VISO TX RICCA (14)	Aqua, Propylheptyl caprylate, Isononyl isononanoate, Dipentaerythrityl hexacaprylate/Hexacaprate, Isodecyl neopentanoate, Squalane, Glycerin, Isopentyldiol, Olus oil, Cetyl alcohol, Glyceryl stearate, Hydrogenated palm oil, Hydrogenated rapeseed oil, Pentaerythrityl distearate, Peucedanum ostruthium leaf extract, Rhododendron ferrugineum extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Rosa canina seed extract, Rosmarinus officinalis leaf extract, Candelilla cera, Capryloyl glycine, Caprylyl glycol, Carbomer, Cellulose gum, Cetearyl alcohol, Ceteth-20, Glyceryl behenate, Glyceryl dibehenate, Hydrogenated vegetable oil, Microcrystalline cellulose, PEG-75 stearate, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Pentylene glycol, Potassium sorbate, Sodium benzoate, o-Cymen-5-ol, Sodium dehydroacetate, Sodium chloride, Sodium hydroxide, Sodium polyacrylate, Coumarin, Parfum, Sodium stearyl lactylate, Sodium sulfate, Steareth-20, Synthetic fluorphlogopite, Tin oxide, Tribehenin, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Citric acid, CI 14700, CI 77891.
CREMA VISO TX LEGGERA (15)	aqua, propylheptyl caprylate, isononyl isononanoate, squalane, polymethyl methacrylate, hydrogenated vegetable oil, glycerin, dipentaerythrityl hexacaprylate/hexacaprate, isopentyldiol, olus oil, cetyl alcohol, glyceryl stearate, pentaerythrityl distearate, peucedanum ostruthium leaf extract, rhododendron ferrugineum extract, taraxacum officinale rhizome/root extract, rosa canina seed extract, rosmarinus officinalis leaf extract, candelilla cera, capryloyl glycine, caprylyl glycol, carbomer, cellulose gum, cetearyl alcohol, ceteth-20, glyceryl behenate, glyceryl dibehenate, microcrystalline cellulose, peg-75 stearate, pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, pentylene glycol, potassium sorbate, sodium benzoate, o-cymen-5-ol, sodium dehydroacetate, sodium chloride, sodium hydroxide, sodium polyacrylate, parfum, coumarin, sodium stearyl lactylate, sodium sulfate, steareth-20, synthetic fluorphlogopite, tin oxide, tribehenin, trisodium ethylenediamine disuccinate, citric acid, ci 14700, ci 77891
FLUIDO VISO (16)	Aqua, Ethylhexyl methoxycinnamate, Homosalate, Caprylyl caprylate/caprinate, Ethylhexyl salicylate, Propanediol dicaprylate, Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, Butyl methoxydibenzoylmethane, Isopentyldiol, Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, Potassium cetyl phosphate, Peucedanum ostruthium leaf extract, Picea abies extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer, Capryloyl glycine, Caprylyl glycol, Citric acid, Ethylhexyl triazone, Glycerin, Lauroyl lysine, o-Cymen-5-ol, Parfum, Coumarin, PEG-8 laurate, Pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, Pentylene glycol, Potassium sorbate, Propanediol, Sodium benzoate, Sodium hydroxide, Styrene/Acrylates copolymer, Tocopheryl acetate, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Undecylenoyl glycine, Xanthan gum.
TONICO IDRATANTE (17)	Aqua, Isopentyldiol, Propanediol, Glycerin, Methyl gluceth-10, Pentylene glycol, Copper gluconate, Magnesium aspartate, Narcissus pseudo-narcissus flower extract, Taraxacum officinale rhizome/root extract, Zinc gluconate, Tamarindus indica seed polysaccharide, Citric acid, Parfum, PEG-40 hydrogenated castor oil, PPG-26-buteth-26, Propylene glycol, Sodium anisate, Sodium levulinate, Trisodium ethylenediamine disuccinate, Xanthan gum, Hexyl cinnamal, Limonene, Linalool, Alpha-isomethyl ionone.

Tabella 4 Prodotti analizzati con INCI

In primis sono stati raccolti i dati delle stabilità delle fasi pilota e industriale eseguiti alle seguenti condizioni:

- $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ anche definito studio di stabilità accelerata
- $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ anche definite studio long-term
- $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

con tempi di controllo definiti nelle tabelle 1 e 2 nel capitolo 4.2.1.

Sono stati raccolti inoltre i dati delle stabilità per le fasi pre-pilota condotte dal laboratorio di Ricerca e Sviluppo alle condizioni tempi di controllo da loro seguiti:

- $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ per 3 mesi
- $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ per 12 mesi
- $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ per 3 mesi

Sono stati considerati nello specifico i parametri: aspetto, colore, odore, pH e viscosità per pre-pilota, pilota, lotti industriali; per i lotti industriali in alcuni casi sono state considerate le stabilità sul primo lotto di taglio standard, in altri si sono valutate le stabilità reali a magazzino a temperatura ambiente di lotti successivi al primo. Questi dati preliminari sono stati inseriti in tabelle riassuntive, suddivisi in base alla temperatura di analisi.

A ciascuna variazione osservata rispetto ai parametri iniziali è stato associato un colore, come descritto nella seguente legenda:

	nessuna variazione
	variazione lieve
	variazione moderata
	variazione non accettabile

Tabella 5 *Legenda analisi di stabilità*

- casella vuota indica nessuna variazione;
- verde se la variazione osservata è lieve ed accettabile;
- giallo se la variazione osservata è moderata, ma comunque accettabile;
- rosso se la variazione osservata è di forte entità, quindi non è accettabile

Per i controlli di stabilità non ancora eseguiti, anche se previsti dal piano, è stata utilizzata la dicitura NE = NON ESEGUITO; le caselle dei controlli non previsti sono state annerite.

Per quanto riguarda la valutazione del colore per i prodotti cosmetici contenenti colorante, all'analisi visiva è stata affiancata l'analisi colorimetrica ed i risultati sono stati riportati nelle tabelle alla voce colore seguendo la seguente legenda:

- Casella vuota se $\Delta E < 1$ e nessuna variazione di colore
- Verde se $1 < \Delta E < 3$ variazione di colore lieve
- Giallo se $3 < \Delta E < 5$ variazione di colore moderata
- Rosso se $\Delta E > 5$ variazione di colore importante

Come esempio dei confronti degli studi di stabilità sono riportate le tabelle 6, 7, 8 riferite alle condizioni di analisi del prodotto 2 (crema mani).

Gli studi di stabilità di questo prodotto dimostrano infatti un andamento particolarmente rappresentativo di quanto si vuole dimostrare.

Il confronto tra l'andamento dello studio in condizioni di accelerata, ovvero a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$, evidenzia infatti un allineamento tra pre-pilota e pilota, sia in termini qualitativi che quantitativi; in pre-pilota inoltre le anomalie emergono in un momento più precoce. Per quanto riguarda invece lo studio condotto in long term, ovvero a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$, si evidenzia come quanto emerge in pre-pilota ed in pilota poi si conferma in modo qualitativamente sovrapponibile e quantitativamente ridotto sui lotti industriali, in un momento successivo.

5°C ± 3°C		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI
T1	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 6 Confronto tra studi di stabilità a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI
T1	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T12	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T24	ASPETTO			
	COLORE		●	
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T36	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE		NE	
	PH			
	VISCOSITA'			
T48	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE		NE	
	PH			
	VISCOSITA'			
OLTRE SCADENZA	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 7 Confronto tra studi di stabilità di fase pre-pilota, pilota e lotti industriali a 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH

40°C ± 2°C, 75% RH ± 5% RH		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI
T1	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE		●	
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 8 Confronto tra studi di stabilità a 40°C ± 2°C, 75 RH ± 5% RH

Ai fini della tesi, a partire da queste tabelle, sono stati ricavati i dati utili e, per ciascun prodotto cosmetico trattato, sono stati riportati in due tabelle riassuntive che confrontano:

- i risultati dei test di stabilità eseguiti su pre-pilota, pilota e lotti industriali alle condizioni di long term, ovvero $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$;
- i risultati dei test di stabilità eseguiti in accelerata, ovvero a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$, sulla pilota e quelli condotti sui lotti a magazzino in long term a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ nel caso del primo lotto industriale o nelle condizioni reali di magazzino nel caso di altri lotti industriali successivi al primo.

Di seguito sono esposti i risultati ottenuti dai confronti per alcuni prodotti oggetto di studio, selezionando i più esemplificativi e interessanti. Le tabelle complete degli studi di stabilità dei prodotti esposti nei risultati non sono riportate per ragioni di spazio, ma sono disponibili per la consultazione.

Tra i prodotti di formulazione recente vengono riportati nelle tabelle seguenti alcuni esempi di risultati osservati in quanto chiaramente esemplificativi dell'andamento comune riscontrato tra i prodotti.

Nelle tabelle 9 e 10 è riportato l'esempio del prodotto 5:

30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI
T1	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE	●	●	●
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T12	ASPETTO			
	COLORE	●	●	●
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T24	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T36	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T48	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
OLTRE SCADENZA	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 9 Confronto tra studi di stabilità di fase pre-pilota, pilota e lotti industriali a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$

		PILOTA 40°C	LOTTI INDUSTRIALI 30°C	
T1	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE	●		●
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T12	ASPETTO			
	COLORE			●
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T24	ASPETTO		NE	
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T36	ASPETTO		NE	
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T48	ASPETTO		NE	
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
OLTRE SCADENZA	ASPETTO		NE	
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 10 Confronto tra stabilità della fase pilota a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ e dei lotti industriali a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ e/o in condizioni reali di conservazione in magazzino.

Al confronto degli studi condotti a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ emergono: per la formula pre-pilota anomalie lievi già ai 3 mesi su colore e odore che si ripresentano con uguale entità ai 6 mesi, mentre ai 12 mesi il colore risulta con una variazione moderata, ma comunque accettabile; nella formula pilota la variazione sul colore emerge in un momento successivo, ovvero ai 6 mesi di stabilità e si mantiene con la stessa intensità anche ai 12 mesi; lo stesso comportamento si ripresenta anche per i lotti industriali.

Il secondo confronto tra la condizione di stabilità accelerata ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$) e long term ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$) mostra che nella stabilità della formula pilota a 40° ai 3 mesi emerge una lieve variazione dell'odore, che è

mantenuta ai 6 mesi, dove emerge anche una lieve anomalia nell'odore. Il cambiamento del colore in particolare è stato confermato nel lotto industriale ai 6 mesi e ai 12 mesi.

Nelle tabelle 11 e 12 sono mostrati i risultati dei confronti svolti per il prodotto 6 (gel idratante) in quanto è un esempio particolarmente dimostrativo della tendenza generale riscontrata:

30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI	
T1	ASPETTO				
	COLORE				
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITA'				
T3	ASPETTO				
	COLORE	●			
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITA'				
T6	ASPETTO				
	COLORE	●	●		
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITA'				
T12	ASPETTO				
	COLORE	●	●		●
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITA'				
T24	ASPETTO				
	COLORE		●		●
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITA'				
T36	ASPETTO				
	COLORE				
	ODORE		NE		NE
	PH				
	VISCOSITA'				
T48	ASPETTO				
	COLORE				
	ODORE		NE		NE
	PH				
	VISCOSITA'				
OLTRE SCADENZA	ASPETTO				
	COLORE				
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITA'				

Tabella 11 Confronto tra studi di stabilità di fase pre-pilota, pilota e lotti industriali a 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH

		PILOTA 40°C	LOTTI INDUSTRIALI 30°C	
T1	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T12	ASPETTO			
	COLORE		●	
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T24	ASPETTO			
	COLORE		●	
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T36	ASPETTO		NE	
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T48	ASPETTO		NE	
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
OLTRE SCADENZA	ASPETTO		NE	
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 12 Confronto tra stabilità della fase pilota a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ e dei lotti industriali a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ e/o in condizioni reali di conservazione in magazzino.

In questo caso il parametro che varia è il colore. Lo schema che si ripete è l'insorgenza della variazione in tempi successivi da un lato con l'avanzare dello scale-up e dall'altro in condizioni normali piuttosto che accelerate.

Nelle tabelle 13 e 14 sono mostrati i risultati dei confronti per il prodotto 9 (crema viso nutriente), anche questo esempio ben esplicativo di quanto si intende dimostrare con questo lavoro:

30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI
T1	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE	●	●	
	PH			
	VISCOSITA'			
T12	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE	●	●	
	PH			
	VISCOSITA'			
T24	ASPETTO		●	●
	COLORE		●	●
	ODORE		●	●
	PH			
	VISCOSITA'			
T36	ASPETTO			NE
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T48	ASPETTO			NE
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
OLTRE SCADENZA	ASPETTO			NE
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 13 Confronto tra studi di stabilità di fase pre-pilota, pilota e lotti industriali a 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH

		PILOTA 40°C	LOTTI INDUSTRIALI 30°C
T1	ASPETTO		
	COLORE	●	
	ODORE	●	
	PH		
	VISCOSITA'		
T3	ASPETTO		
	COLORE	●	
	ODORE	●	
	PH		
	VISCOSITA'		
T6	ASPETTO	●	
	COLORE	●	
	ODORE	●	
	PH		
	VISCOSITA'		
T12	ASPETTO		●
	COLORE		
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T24	ASPETTO		●
	COLORE		●
	ODORE		●
	PH		
	VISCOSITA'		
T36	ASPETTO		NE
	COLORE		
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T48	ASPETTO		NE
	COLORE		
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
OLTRE SCADENZA	ASPETTO		NE
	COLORE		
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		

Tabella 14 Confronto tra stabilità della fase pilota a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ e dei lotti industriali a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ e/o in condizioni reali di conservazione in magazzino

Le anomalie sono riscontrate principalmente in colore e odore. Il colore nella prova pre-pilota risulta lievemente modificato già al primo controllo, e dal terzo mese la variazione risulta moderata; questo stesso cambiamento di intensità si ripresenta nella prova pilota, ma emergendo successivamente, al controllo dei 6 mesi; nei lotti industriali si conferma la variazione di colore, che tuttavia emerge dai 12 mesi e in misura lieve. L'odore nella prova pre-pilota varia dal primo controllo e ai 12 mesi la variazione è moderata. In fase pilota si rileva una variazione lieve dai 6 mesi e diventa di entità moderata ai 24 mesi. Analogamente al colore, anche l'odore nei

lotti industriali emerge tardi e di entità lieve. In fase pilota in questo caso si osserva una lieve variazione nell'aspetto al controllo dei 24 mesi.

Il confronto tra la stabilità accelerata, condotta in condizioni di elevate temperature e umidità, e la stabilità a lungo termine svolta per il prodotto nella fase industriale a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$, ripropone un andamento simile per colore e odore; in questo caso la stabilità accelerata ha mostrato una lieve anomalia nell'aspetto, che si è confermata nei lotti industriali, sempre in fasi più avanzate.

Gli esempi che seguono sono i risultati ottenuti dai prodotti con formulazione storica analizzati, anch'essi selezionati in quanto sia esemplificativi di un confronto completo delle stabilità fino alla scadenza del prodotto, sia rappresentativi dell'andamento generale riscontrato.

Nella tabella 15 e 16 sono mostrati i risultati dei confronti per il prodotto 14 (crema viso texture ricca):

30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI
T1	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T12	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE	●	●	
	PH			
	VISCOSITA'			
T24	ASPETTO			
	COLORE		●	
	ODORE		●	
	PH			
	VISCOSITA'			
T36	ASPETTO			
	COLORE		●	
	ODORE		●	
	PH			
	VISCOSITA'			
T48	ASPETTO			
	COLORE		●	
	ODORE		●	
	PH			
	VISCOSITA'			
OLTRE SCADENZA	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 15 Confronto tra studi di stabilità di fase pre-pilota, pilota e lotti industriali a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$

		PILOTA 40°C	LOTTI INDUSTRIALI 30°C
T1	ASPETTO		
	COLORE	●	
	ODORE	●	
	PH		
	VISCOSITA'		
T3	ASPETTO		
	COLORE	●	
	ODORE	●	
	PH		
	VISCOSITA'		
T6	ASPETTO		
	COLORE	●	
	ODORE	●	
	PH		
	VISCOSITA'		
T12	ASPETTO		
	COLORE		
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T24	ASPETTO		
	COLORE		●
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T36	ASPETTO		
	COLORE		●
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T48	ASPETTO		
	COLORE		●
	ODORE		●
	PH		
	VISCOSITA'		
OLTRE SCADENZA	ASPETTO		
	COLORE		●
	ODORE		●
	PH		
	VISCOSITA'		

Tabella 16 Confronto tra stabilità della fase pilota a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ e dei lotti industriali a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ e/o in condizioni reali di conservazione in magazzino

Per questa formula i risultati mostrano andamenti simili a quelli sopra esposti per i prodotti recenti e in aggiunta riportano il comportamento del prodotto anche a scadenza (48 mesi). In particolare le variazioni del colore nella prova pilota a 48 mesi rispecchiano quello che è emerso nel lotto industriale a scadenza.

E nella seconda tabella di confronto la variazione di colore moderata a 6 mesi di studio di stabilità accelerata è predittiva del cambiamento di colore nei lotti industriali che emerge a 36 mesi.

Il fatto che il colore risulti non accettabile a scadenza o oltre scadenza conferma la shelf-life assegnata.

Nella tabella 17 e 18 sono mostrati i risultati dei confronti per il prodotto 15 (crema viso texture leggera):

30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI
T1	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T12	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE	●		
	PH			
	VISCOSITA'			
T24	ASPETTO			
	COLORE		●	●
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T36	ASPETTO			
	COLORE		●	●
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T 48	ASPETTO			
	COLORE		●	●
	ODORE			●
	PH			
	VISCOSITA'			
OLTRE SCADENZA	ASPETTO			
	COLORE			●
	ODORE			●
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 17 Confronto tra studi di stabilità di fase pre-pilota, pilota e lotti industriali a 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH

		PILOTA 40°C	LOTTI INDUSTRIALI 30°C
T1	ASPETTO		
	COLORE	●	
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T3	ASPETTO		
	COLORE	●	
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T6	ASPETTO		
	COLORE	●	
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T12	ASPETTO		
	COLORE		
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T24	ASPETTO		
	COLORE		●
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T36	ASPETTO		
	COLORE		●
	ODORE		
	PH		
	VISCOSITA'		
T48	ASPETTO		
	COLORE		●
	ODORE		●
	PH		
	VISCOSITA'		
OLTRE SCADENZA	ASPETTO		
	COLORE		●
	ODORE		●
	PH		
	VISCOSITA'		

Tabella 18 Confronto tra stabilità della fase pilota a 40°C ± 2°C, 75 RH ± 5% RH e dei lotti industriali a 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH e/o in condizioni reali di conservazione in magazzino

Questo prodotto di formulazione storica mostra ancora una volta come le variazioni, di colore e odore, osservate in fase pre-pilota si ripropongano traslate nel tempo con intensità minori o uguali anche in fase pilota e nei lotti industriali. E parallelamente anche il cambiamento moderato del colore ai controlli dei 3 mesi e 6 mesi della fase pilota in condizioni di stabilità accelerata si ritrova nei lotti industriali dai 48 mesi. I risultati ottenuti hanno dimostrato andamenti ripetuti che possono essere riassunti in una tendenza comune: si è osservato che da un punto di vista qualitativo le anomalie si presentano a tutte le fasi di sviluppo e da un punto di vista quantitativo si è osservata una riduzione o un mantenimento dell'intensità dei fenomeni nel

corso dello scale-up. Inoltre, si è notato che per tagli minori le anomalie emergono anticipatamente, mentre in un momento successivo per i tagli maggiori. Una spiegazione potrebbe essere che l'aumento di scala associato al passaggio da prove di laboratorio a lotti industriali, quindi a standard produttivi migliori, renda più stabili le formulazioni.

Dal secondo confronto impostato i risultati mostrano che nel corso della stabilità long term dei lotti industriali emergono anomalie anche in questo caso principalmente organolettiche (colore e odore) sia per intensità, sia per quantità (numero di parametri coinvolti), minore o uguale rispetto alla pilota in condizione di accelerata e in un tempo generalmente successivo. Questo è dovuto, da un punto di vista pratico, al confronto tra una condizione particolarmente stressante in termini di temperatura ed umidità con una condizione reale di conservazione, quindi quello che si osserva in condizione di stabilità accelerata poi effettivamente emerge, ma più tardi, proprio dovuto al fatto che le condizioni di conservazione reale prevedono una temperatura e umidità meno estreme.

Entrambi i confronti risultano pertanto dimostrativi del fatto che gli studi di stabilità, e in particolare la condizione accelerata, sono predittivi del comportamento della formula, ovvero di quelle che sono le variazioni organolettiche, sia in termini qualitativi che quantitativi, che emergono durante la shelf-life reale.

Quanto sopra esposto descrive un andamento generale, tuttavia, in alcuni casi si sono osservati degli scostamenti, per lo più imputabili a differenze che si possono osservare tra lotti diversi o mancanza di informazioni complete, ma comunque alla fine riconducibili a una situazione simile a quella sopra esposta e sempre nell'ordine della variazione lieve, dunque rientrante nell'intervallo di accettabilità.

5.1.1 CASI STUDIO

Durante lo sviluppo di una nuova formula non sempre le formulazioni risultano avere dei profili di stabilità accettabili fin dalle prime prove; talvolta può infatti capitare che dagli studi di stabilità su prove pre-pilota o pilota emergano delle anomalie che possono fornire un precoce avvertimento riguardo i problemi di stabilità e permettono a Ricerca e Sviluppo di intraprendere già delle modifiche allo stadio iniziale di formulazione riducendo le tempistiche di sviluppo. Quando accade

dunque che una formula risulti instabile già dai primi controlli mostrando alterazioni dei parametri organolettici, chimico-fisici o microbiologici, si interviene a livello formulativo e si riesegue lo studio di stabilità fintanto che non si raggiunge un prodotto con stabilità accettabile in fase pre-pilota e pilota e che quindi corrisponda poi ad un prodotto industriale stabile.

Qui di seguito sono esposti due casi studio; quanto riportato nelle tabelle 19 e 20 come confronto sugli avanzamenti dei progetti si riferisce alla sola stabilità accelerata, in quanto considerata condizione maggiormente predittiva e pertanto utilizzata in azienda per eseguire le opportune valutazioni circa l'approvazione della formula per il passaggio alla produzione industriale. Lo studio condotto a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$, prevedendo condizioni di temperatura ed umidità particolarmente stressanti, consente infatti di far emergere in tempi brevi eventuali anomalie gravi che richiedono di revisionare la formula.

1)PRODOTTO 12. In tale crema la problematica emersa riguardava sia una questione estetica che funzionale. Come mostrato nella tabella 19, già a un mese di stabilità accelerata la formulazione pilota mostrava visivamente un aspetto alterato, molto fluido rispetto al tempo zero, e quindi non compatibile con il packaging definitivo (vaso). Operativamente il laboratorio Ricerca e Sviluppo è quindi tornato alla fase di prototipizzazione intervenendo sui modificatori reologici presenti nella crema. È stata prodotta una seconda formulazione pilota che ha mostrato in un primo momento un miglioramento dell'aspetto, la variazione risultava tuttavia moderata, e al controllo successivo dei tre mesi si è riconfermata la problematica con la stessa entità, supportata anche da una variazione di viscosità importante rispetto a quella iniziale. La prova pilota è stata bloccata e riformulato nuovamente il prodotto. La terza formulazione pilota ha mostrato un profilo di stabilità accettabile, i cambiamenti osservati sono stati lievi e si è quindi proceduto con lo scale-up industriale. Ulteriore conferma della stabilità della terza formula si è avuta dallo studio di stabilità in long term sui lotti industriali.

40°C ± 2°C, 75% RH ± 5% RH		I PILOTA	II PILOTA	III PILOTA
T1	ASPETTO	●	●	
	COLORE			●
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITÀ			
T3	ASPETTO		●	●
	COLORE			●
	ODORE			●
	PH			
	VISCOSITÀ		●	●
T6	ASPETTO			●
	COLORE			●
	ODORE			●
	PH			
	VISCOSITÀ			●

Tabella 19 Confronto tra stabilità a 40°C ± 2°C, 75 RH ± 5% RH di prove pilota relative al prodotto 12

2) **PRODOTTO 13.** In questo caso è coinvolta una soluzione e dagli studi di stabilità era emersa una problematica puramente estetica, relativa al colore. Dai primi risultati sulla stabilità della formulazione pilota è emerso che la soluzione andava incontro ad ingiallimento, risultando in una variazione ben percepibile anche dal consumatore, perciò non accettabile. Il packaging di destinazione era trasparente quindi era necessario che il colore fosse conforme e stabile. Il laboratorio di Ricerca e Sviluppo è intervenuto nella riformulazione aggiustando la percentuale di antiossidante. La seconda preparazione pilota è risultata leggermente migliore della prima, ma comunque non conforme al terzo mese di stabilità. Lo stesso andamento si è riproposto anche per la terza preparazione pilota con una uguale entità di variazioni, ma emerse in questo caso a partire dai tre mesi, risultando in una formula non conforme ai sei mesi di stabilità. La quarta prova infine è risultata organoletticamente stabile per l'intera durata dello studio, come successivamente confermato dallo studio di stabilità a lungo termine sui lotti industriali.

40°C ± 2°C, 75% RH ± 5% RH		I PILOTA	II PILOTA	III PILOTA	IV PILOTA
T1	ASPETTO				
	COLORE	●	●		
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITÀ'				
T3	ASPETTO				
	COLORE		●	●	●
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITÀ'				
T6	ASPETTO				
	COLORE			●	●
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITÀ'				

Tabella 20 Confronto tra stabilità a 40°C ± 2°C, 75 RH ± 5% RH di prove pilota relative al prodotto 13

5.2 CONFRONTO TRA LA STABILITÀ DEI PRODOTTI FINITI E DELLE MATERIE PRIME IN ESSI CONTENUTE

A questo scopo è stato impostato uno studio di stabilità coinvolgendo 24 materie prime, riportate in tabella 21, presenti nelle formule di 12 prodotti tra quelli oggetto di studio (prodotti 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

MATERIE PRIME
Radice di Tarassaco
Mix multiminerale
Olio di rosa canina
Principio 46-12®
Rosa Gallica
Nettare di Imperatoria
Estratto di Gelso
Estratto di Zafferano
Estratto di Rosa alpina
Estratto di Salvia
Miele delle Alpi
Papavero
Estratto di abete rosso
Scutellaria Alpina
Crocus
Semi di tamarindo
Olio di nocciola
Burro di lampone e ribes
Colorante
Profumo 1
Profumo 2
Profumo 3
Profumo 4
Profumo 5

Tabella 21 Materie prime analizzate

In particolare sono stati selezionati i principali estratti naturali, i profumi ed il colorante, dove presente. Le materie prime sono state analizzate tal quali ed in alcuni casi si è valutato anche il mix di quelle presenti in formula, preparato seguendo la modalità esposta in materiali e metodi.

Le valutazioni di confronto sono state eseguite sui test svolti in condizione di studio di stabilità accelerata ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$) come riportato nelle tabelle. In particolare, le variazioni osservate hanno coinvolto i parametri organolettici colore e odore. Di seguito vengono esposti alcuni risultati ottenuti, che risultano essere esemplificativi dell'andamento generale riscontrato.

La tabella 22 riporta il confronto relativo al prodotto 1 (crema viso detergente). Il profumo e quasi tutti gli estratti coinvolti già al primo mese di stabilità mostravano una lieve variazione del colore, che per il profumo e l'olio di rosa canina si è intensificato ai tre mesi. Una lieve variazione dell'odore è emersa già al primo mese per la materia prima nettare di imperatoria e ai tre mesi anche per il profumo, mentre è variata moderatamente per l'olio di rosa canina. Queste variazioni di colore e odore sono presenti anche nella stabilità accelerata della pilota, mantenendo tuttavia un'entità lieve.

CREMA VISO DETERGENTE		PILOTA 40°C	PROFUMO 1	RADICE DI TARASSACO	OLIO DI ROSA CANINA	NETTARE DI IMPERATORIA	OLIO DI NOCCIOLA
T1	ASPETTO						
	COLORE		●	●	●	●	
	ODORE					●	
	PH						
	VISCOSITA'						
T3	ASPETTO						
	COLORE	●	●	●	●	●	
	ODORE	●	●		●	●	
	PH						
	VISCOSITA'						
T6	ASPETTO						
	COLORE	●					
	ODORE	●					
	PH						
	VISCOSITA'						

Tabella 22 Confronto studi di stabilità tra fase pilota e materie prime a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$

Nella tabella 23 relativa al prodotto 9 (crema viso nutriente) si evidenzia che per il parametro colore c'è stata una variazione lieve di tutte le materie prime già dal primo mese, che si è accentuata ai tre mesi per il profumo e per l'olio di rosa canina. Cambiamenti nell'odore si sono verificati dal primo mese per la materia prima nettare di imperatoria, mentre ai tre mesi sono emerse variazioni lievi per il profumo e l'estratto di rosa alpina e moderate per l'olio di rosa canina. Nella formula pilota si riscontrano variazioni negli stessi parametri con un'entità minore o uguale.

Nelle figure 37 e 38 viene mostrato un confronto tra le diverse temperature di stabilità relative all'olio di rosa canina, come esempio di variazione di colore moderata emersa in stabilità accelerata ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$).

CREMA VISO NUTRIENTE		PILOTA 40°C	PROFUMO 1	RADICE DI TARASSACO	OLIO DI ROSA CANINA	NETTARE DI IMPERATORIA	ESTRATTO DI ROSA ALPINA
T1	ASPETTO						
	COLORE	●	●	●	●	●	●
	ODORE	●				●	
	PH						
	VISCOSITA'						
T3	ASPETTO						
	COLORE	●	●	●	●	●	●
	ODORE	●				●	●
	PH						
	VISCOSITA'						
T6	ASPETTO	●					
	COLORE	●					
	ODORE	●					
	PH						
	VISCOSITA'						

Tabella 23 Confronto studi di stabilità tra fase pilota e materie prime a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\text{ RH} \pm 5\%$ RH



Figura 37 Studio di stabilità dell'olio di rosa canina al tempo zero



Figura 38 Studio di stabilità dell'olio di rosa canina al terzo controllo

Nella tabella 24 riferita al prodotto 6 (gel idratante) si registrano variazioni lievi per colore e/o odore al primo mese per alcune materie prime (profumo, radice di tarassaco, mix multiminerale, principio 46-12®); successivamente al secondo controllo dei 3 mesi ci sono stati o nuovi cambiamenti o intensificazione di quanto già emerso in precedenza. In questo caso la formula pilota confrontata mostra un andamento sovrapponibile per il parametro colore, non si evidenziano invece variazioni di odore.

A titolo di esempio di una variazione di colore lieve sono riportate le Figure 39 e 40 relative alla materia prima Principio 46-12®.

GEL IDRATANTE		PILOTA 40°C	PROFUMO 4	RADICE DI TARASSACO	MIX MULTIMINERALE	PRINCIPIO 46-12®	SCUTELLARIA ALPINA	SEMI DI TAMARINDO
T1	ASPETTO							
	COLORE	●		●		●		
	ODORE		●		●	●		
	PH							
T3	ASPETTO							
	COLORE	●	●	●	●	●		
	ODORE		●		●	●		
	PH		●		●	●		
T6	ASPETTO							
	COLORE	●						
	ODORE							
	PH							
T6	ASPETTO							
	COLORE							
	ODORE							
	PH							
T6	ASPETTO							
	COLORE							
	ODORE							
	PH							
T6	ASPETTO							
	COLORE							
	ODORE							
	PH							
T6	ASPETTO							
	COLORE							
	ODORE							
	PH							
T6	ASPETTO							
	COLORE							
	ODORE							
	PH							
T6	ASPETTO							
	COLORE							
	ODORE							
	PH							
T6	ASPETTO							
	COLORE							
	ODORE							
	PH							
T6	ASPETTO							
	COLORE							
	ODORE							
	PH							

Tabella 24 Confronto studi di stabilità tra fase pilota e materie prime a 40°C ± 2°C, 75 RH ± 5% RH

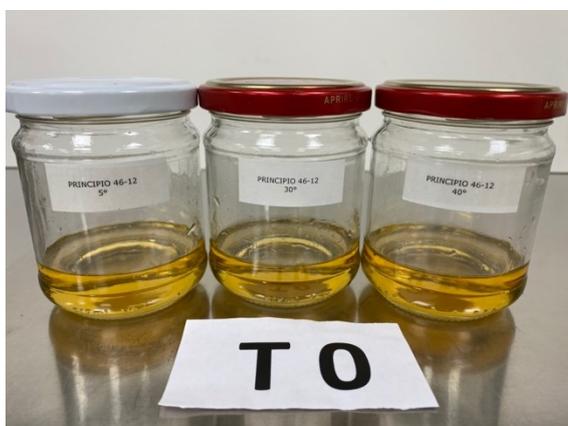


Figura 39 Studio di stabilità del Principio 46-12® al tempo zero

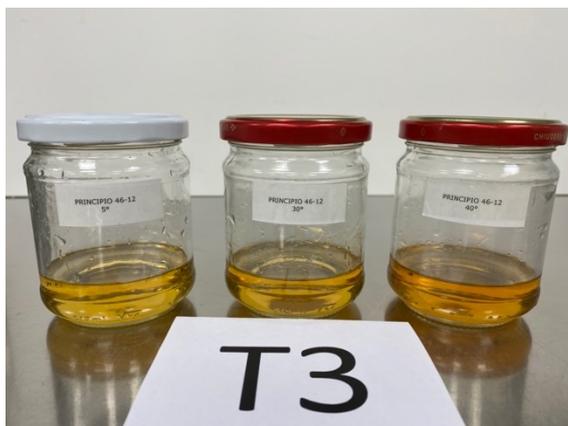


Figura 40 Studio di stabilità del Principio 46-12® al terzo controllo

A completamento delle considerazioni sulle variazioni di colore, nei prodotti contenenti coloranti è stato aggiunto al confronto anche il mix di materie prime con colorante. I prodotti coinvolti sono il prodotto 4 (la crema viso anti-tetà pelli secche) e il prodotto 5 (siero viso). I risultati di entrambe sono inseriti in tabella 25 e 26 e mostrano come le singole materie prime (profumo 3 ed estratto di rosa gallica)

hanno avuto una variazione del colore moderata, che tuttavia nel mix è risultata in un cambiamento lieve, motivato dalla presenza del colorante che maschera la comparsa delle variazioni di colore. Tale risultato è coerente con quanto si ritrova nelle formule pilota.

Inoltre, per ottenere un dato oggettivo sull'entità della variazione di colore è stata impiegato il colorimetro per il mix con colorante. Come target sono stati considerati i valori ricavati al tempo zero ($L^*=45,77$ $a^*=12,90$ $b^*=12,49$), dove L^* indica la luminosità mentre a^* e b^* le coordinate di cromaticità, ovvero le direzioni del colore (paragrafo 4.1.1). La differenza di colore riscontrata al controllo dei tre mesi di studio di stabilità accelerata ($40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$) è espressa dal valore $\Delta E=1,61$. Tale variazione, per definizione, risulta poco distinguibile con la sola osservazione.

CREMA VISO ANTIETÀ PELLI SECCHE		PILOTA 40°C	PROFUMO 3	RADICE DI TARASSACO	ROSA GALLICA	ESTRATTO DI ZAFFERANO	CROCUS	MIX MATERIE PRIME CON COLORANTE
T1	ASPETTO							
	COLORE	●	●	●	●	●		●
	ODORE		●					●
	PH							
VISCOSITA'								
T3	ASPETTO							
	COLORE	●	●	●	●	●		●
	ODORE	●	●		●		●	●
	PH							
VISCOSITA'								
T6	ASPETTO							
	COLORE	●						
	ODORE	●						
	PH							
VISCOSITA'								

Tabella 25 Confronto studi di stabilità tra fase pilota e materie prime a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$

SIERO VISO		PILOTA 40°C	PROFUMO 3	RADICE DI TARASSACO	ROSA GALLICA	ESTRATTO DI ZAFFERANO	CROCUS	MIX MATERIE PRIME CON COLORANTE
T1	ASPETTO							
	COLORE		●	●	●	●		●
	ODORE		●					●
	PH							
VISCOSITA'								
T3	ASPETTO							
	COLORE	●	●	●	●	●		●
	ODORE		●		●		●	●
	PH							
VISCOSITA'								
T6	ASPETTO							
	COLORE	●						
	ODORE	●						
	PH							
VISCOSITA'								

Tabella 26 Confronto studi di stabilità tra fase pilota e materie prime a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$

Questo studio ha permesso di delineare un andamento generale, ovvero che una variazione organolettica nella materia prima corrisponde ad una variazione organolettica nella formula, con un'entità in quest'ultima minore o uguale, a parità di tempo di studio. Ciò conferma l'ipotesi che i cambiamenti organolettici riscontrati nel prodotto sono imputabili ai profumi ed agli estratti presenti nella formula. Il fatto che la variazione sia quantitativamente minore nei prodotti finiti è

probabilmente imputabile alla presenza in questi ultimi di sostanze antiossidanti e stabilizzanti che limitano l'insorgenza dei fenomeni.

Il fatto che le materie prime mostrino una maggior propensione a deteriorarsi è possibile associarlo alla loro origine naturale e conseguente ampia composizione in varie classi di molecole, in particolare, tra le principali, i polifenoli. Questi ultimi infatti sono molto rappresentati nelle materie prime di origine naturale utilizzate come ingredienti all'interno delle preparazioni cosmetiche. I composti polifenolici costituiscono un gruppo eterogeneo di componenti naturali comunemente presenti in varie specie vegetali. Questi includono acidi fenolici, tannini, flavonoidi, antociani, lignani e neolignani. Per la struttura chimica dei composti polifenolici, in particolare la presenza di uno o più anelli di idrocarburi aromatici con legati almeno due gruppi ossidrilici (-OH), i composti che li contengono hanno proprietà antiossidanti. Il meccanismo della loro attività antiossidante è principalmente correlato allo scavenging dei radicali liberi e grazie a questo arricchiscono le formule di ulteriori attività funzionali (Adamska-Szewczyk et al., 2019).

Tuttavia, la loro stessa natura chimica li rende anche dei potenziali pro-ossidanti generando specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'eccesso di ROS provoca un aumento della perossidazione lipidica con conseguente modifica di colore e odore dei prodotti. I composti fenolici, inoltre, se per la presenza di ossigeno vanno incontro ad ossidazione, possono essere modificati nella loro struttura, portando alla formazione di composti colorati causa di imbrunimento dei materiali.

Analogamente si è ragionato sulla classe principale di molecole presenti nei profumi. I profumi utilizzati all'interno delle formulazioni sono miscele di sostanze naturali e di sintesi all'interno delle quali si trovano i terpeni. Si tratta di una vasta famiglia di composti chimici naturali della serie degli idrocarburi, contenuti soprattutto negli oli essenziali estratti da un gran numero di piante. Strutturalmente presentano una formula bruta multipla di quella dell'isoprene (C_5H_8) e uno scheletro di atomi di carbonio disposti secondo la cosiddetta regola isoprenica. Sulla base del numero di unità isopreniche che costituiscono la molecola i terpeni si suddividono in terpeni semplici o monoterpeni, ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpeni, ($C_{15}H_{24}$) diterpeni ($C_{20}H_{32}$), sesterterpeni ($C_{25}H_{40}$) e triterpeni, ($C_{30}H_{48}$). Molto più numerosi e diffusi sono tuttavia i loro derivati detti terpenoidi, ossia alcoli, aldeidi, chetoni, acidi carbossilici, eteri, che, oltre ad avere il medesimo scheletro di atomi di

carbonio dei terpeni, presentano atomi di ossigeno sotto forma, per esempio, di gruppi funzionali alcolici o aldeidici. I terpeni, oltre a contribuire all'odore, possono agire come antiossidanti diretti attraverso meccanismi di scavenging dei radicali liberi o come antiossidanti indiretti migliorando lo stato antiossidante. Tuttavia, è stato dimostrato che il comportamento antiossidante e pro-ossidante di un particolare terpene dipende soprattutto dalla sua quantità: a basse concentrazioni possono agire come composti antiossidanti, mentre ad alte concentrazioni i terpeni possono agire come composti pro-ossidanti (Baccouri et al., 2021).

Pertanto, i polifenoli all'interno degli estratti naturali, e parallelamente i terpeni nei profumi, in virtù della loro struttura chimica e relativa funzione possono portare in certe condizioni alla modifica e alterazione delle formulazioni. Questo va a supporto dei cambiamenti osservati nell'esperimento svolto.

5.3 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA PREDITTIVA DEL CHALLENGE TEST

Questa serie di esperimenti ha come scopo la valutazione dell'efficacia predittiva del challenge test, come strumento per l'analisi delle performance della tenuta del sistema conservante presente nei diversi cosmetici oggetto di studio. Per questo lavoro di tesi sono stati dunque inizialmente confrontati i risultati dei challenge test svolti presso laboratori esterni seguendo il metodo indicato nella Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, nella fase di pre-pilota e pilota dello sviluppo di tutte i diciassette cosmetici in esame.

Come riportato in tabella 28 le formulazioni incontravano tutte il criterio A. Lo scopo del test, infatti, consiste nel verificare l'efficacia dell'attività antimicrobica di un sistema conservante, simulando un eventuale attacco microbico del prodotto allo scopo di valutarne sperimentalmente la stabilità microbiologica nel corso dell'intera vita, dalla produzione all'utilizzo. Al termine del test viene assegnato al prodotto un criterio di accettabilità: questi criteri di valutazione dell'attività antimicrobica variano per le diverse categorie di preparati e sono espressi in termini di logaritmo della riduzione del numero di microrganismi vivi rispetto al valore ottenuto per l'inoculo utilizzato. Quelli osservati nelle preparazioni per uso topico, che sono stati applicati anche ai prodotti cosmetici oggetto di studio, sono riportati nella tabella 27.

	Riduzione logaritmica			
	2 d	7 d	14 d	28 d
Batteri A	2	3	—	NI
B	—	—	3	NI
Funghi A	—	—	2	NI
B	—	—	1	NI

NI=nessun incremento

Tabella 27 Preparazioni per uso topico (Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana XII Edizione-2008)

Dove gli inoculi coinvolti nel test (10^5 - 10^6 microrganismi per millilitro o per grammo di preparato) sono per i batteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Gram -); *Escherichia coli* ATCC 8739 (Gram -); *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (Gram -); *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram +); per i funghi *Candida albicans* ATCC 10231; *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404;

I criteri A esprimono l'efficacia consigliata da raggiungere ed indicano che il prodotto cosmetico è considerato protetto contro la proliferazione microbica e non è necessario considerare altri fattori indipendenti dalla formulazione, ad esempio un packaging maggiormente protettivo, indicazione invece necessaria nel caso una formulazione incontri il criterio B.

Per la fase analitica successiva sono stati recuperati un totale di 50 lotti a magazzino. In particolare, come riportato in tabella 28, i lotti selezionati erano caratterizzati da shelf-life residue variabili coprendo diversi stadi di vita dei prodotti: da pochi mesi dalla produzione, fino al raggiungimento e superamento della scadenza dei 48 mesi. Questa scelta è motivata dalla necessità di verificare la reale tenuta del sistema conservante e quindi l'effettiva predittività del challenge test per tutta la vita a scaffale dei prodotti. Come riportato in tabella 28 l'esito per tutti i campioni testati è stato <10 UFC/ml sia per la conta nel terreno TSA (batteri mesofili aerobi) che nel terreno SDA (lieviti e muffe). In due dei lotti analizzati è stata osservata la crescita di 10 UFC/ml nel terreno TSA.

Per verificare ulteriormente l'efficacia e capacità di mantenersi nel tempo del sistema conservante, è stato svolto anche un test definito "test in uso" per una selezione di lotti più recenti tra quelli analizzati nella prima fase. Questo test consiste nel simulare attivamente l'utilizzo reale del prodotto da parte di un consumatore e prevede una prima analisi microbiologica del prodotto, un suo successivo utilizzo quotidiano secondo le personali abitudini per il periodo di un mese e una seconda analisi microbiologica di controllo al termine. Per alcuni prodotti, infatti, non erano disponibili a magazzino lotti in scadenza o scaduti e quindi in questi casi si è deciso di dimostrare comunque l'efficacia predittiva del challenge test sfidando in maniera più audace il sistema conservante. I prodotti cosmetici coinvolti sono state 12 creme ed i lotti sottoposti al test sono stati in totale 35. Per lo svolgimento si è applicato il protocollo interno esposto nei materiali e metodi. In particolare, dei lotti in esame a seguito dell'utilizzo quotidiano per il periodo di un mese è stato eseguito un doppio campionamento prelevando un volume di prodotto pari a 1 ml. L'analisi è stata poi condotta seguendo i protocolli ISO 21149 e 16212 (paragrafo 4.2.2.1) e i risultati ottenuti dopo 72 h per le piastre incubate a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ e dopo 5 giorni per le piastre incubate a $25^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ hanno dato esito <10 UFC/ml sia per la conta di batteri mesofili aerobi sia per lieviti e muffe (tabella 28).

Non avendo rilevato crescita nelle piastre per le analisi microbiologiche svolte sia sui campioni di lotti scaduti sia sui lotti recenti coinvolti nel test in uso, e risultando quindi in una carica microbica <10 UFC/ml, è stato dimostrato che il sistema conservante protegge le formule dalla contaminazione microbiologica nel corso della shelf-life verificando quindi la predittività del challenge test svolto nelle prime fasi dello sviluppo. Il challenge test con criterio A, infatti per definizione considera una formula protetta contro la contaminazione microbica e i test svolti hanno confermato sperimentalmente che questo si mantiene per tutto il periodo di vita dei prodotti coinvolti nello studio. Avendo infatti analizzato microbiologicamente in particolare i prodotti scaduti ed avendo confermato che la carica microbica rilevata è entro i limiti richiesti, è stato dimostrato che non ci sono state alterazioni della qualità microbiologica nel corso della shelf-life di questi prodotti. A completamento dello scopo si è integrato nell'analisi il test in uso per i prodotti non ancora scaduti, poiché la sola analisi microbiologica poteva non risultare sufficientemente

dimostrativa dell'efficacia predittiva del challenge per l'intera shelf-life in quanto si trattava di prodotti di recente produzione. Questi prodotti, con vita residua variabile, dimostrandosi non contaminati anche a seguito di un uso ripetuto quotidianamente, dimostrano che il sistema conservante in essi contenuto è attivo ed efficace, risultato nuovamente a sostegno della predittività del challenge test.

PRODOTTO	CHALLENGE PRE-PILOTA	CHALLENGE PILOTA	LOTTI ANALIZZATI	MESI DALLA PRODUZIONE	ANALISI MICROBIOLOGICA	TEST IN USO
CREMA VISO DETERGENTE (1)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	6, 11, 12	<10; <10	OK
CREMA MANI (2)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	7, 10, 11	<10; <10	OK
CONTORNO OCCHI (3)	CRITERIO A	CRITERIO A	2	5, 8	<10; <10	OK
CREMA VISO ANTIETA' PELLI SECCHE (4)	CRITERIO A	CRITERIO A	2	7, 7	<10*; <10	OK
SIERO VISO (5)	CRITERIO A	CRITERIO A	2	3, 7	<10; <10	OK
GEL IDRATANTE (6)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	4, 15, 25	<10; <10	OK
CREMA VISO IDRATANTE (7)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	6, 16, 18	<10; <10	OK
SIERO ANTI-AGE (8)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	4, 14, 17	<10; <10	OK
CREMA VISO NUTRIENTE (9)	CRITERIO A	CRITERIO A	2	5, 16	<10; <10	OK
CREMA CORPO (10)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	3, 10, 11	<10; <10	OK
LATTE CORPO (11)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	3, 11, 12	<10; <10	OK
CREMA VISO ANTIETA' PELLI SENSIBILI (12)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	7, 11, 12	<10; <10	OK
ACQUA SPRAY (13)	CRITERIO A	CRITERIO A	2	38, 38	<10; <10	
CREMA VISO TX RICCA (14)	CRITERIO A	CRITERIO A	6	13, 16, 17, 28, 52(scaduto), 53(scaduto)	<10*; <10	OK
CREMA VISO TX LEGGERA (15)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	30, 52(scaduto), 53(scaduto)	<10; <10	
FLUIDO VISO (16)	CRITERIO A	CRITERIO A	4	20, 37, 51(scaduto), 53(scaduto)	<10; <10	
TONICO IDRATANTE (17)	CRITERIO A	CRITERIO A	3	24, 33, 36	<10; <10	

* un lotto ha avuto crescita 10 UFC/ml

Tabella 28 Risultati analisi microbiologiche

5.4 OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI AZIENDALI

Attraverso i risultati ottenuti da questa tesi si intendeva valutare una possibile proposta di ottimizzazione dei protocolli analitici nel corso dello sviluppo di nuove formule. A tal fine l'elaborazione e interpretazione si è concentrata sui confronti impostati per la condizione di $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ nelle varie fasi di sviluppo, considerando in particolar modo il comportamento di pre-pilota e pilota.

Questa condizione è stata selezionata tra le altre oggetto di studi di stabilità in quanto è l'unica alla quale si ha un confronto reale con il lotto industriale. Gli aspetti della formula indagati e le modalità di studio riprendono quelle esposte per lo scopo 'valutazione dell'efficacia predittiva degli studi di stabilità'. I risultati ottenuti hanno mostrato andamenti simili, pertanto sono commentate qui di seguito alcune tabelle esemplificative.

La tabella 29 mostra i risultati dei confronti del prodotto 2 (crema mani). La specifica oggetto di alterazione è il colore: in fase pre-pilota è stata registrata una lieve variazione a partire dai 3 mesi di stabilità che, ai 6 e poi anche ai 12 mesi, è risultata moderata. In fase pilota questo cambiamento si è notato in maniera prima lieve e poi moderata, ma a partire dai 12 mesi.

30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI
T1	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T3	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T6	ASPETTO			
	COLORE	●		
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T12	ASPETTO			
	COLORE	●	●	
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T24	ASPETTO			
	COLORE		●	●
	ODORE			
	PH			
	VISCOSITA'			
T36	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE		NE	NE
	PH			
	VISCOSITA'			
T48	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE		NE	NE
	PH			
	VISCOSITA'			
OLTRE SCADENZA	ASPETTO			
	COLORE			
	ODORE			NE
	PH			
	VISCOSITA'			

Tabella 29 Confronto tra studi di stabilità di fase pre-pilota, pilota e lotti industriali a 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH

La tabella 30 è relativa al prodotto 11 (latte corpo). Il colore e l'odore mostrano una modifica lieve ai 6 e 12 mesi in pre-pilota; in pilota le variazioni emergono sulle medesime specifiche e con tempi e entità sovrapponibili.

30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH		PRE-PILOTA	PILOTA	LOTTI INDUSTRIALI	
T1	ASPETTO				
	COLORE				
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITA'				
T3	ASPETTO				
	COLORE				
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITA'				
T6	ASPETTO				
	COLORE	●	●		●
	ODORE	●	●		
	PH				
	VISCOSITA'				
T12	ASPETTO				
	COLORE	●	●		●
	ODORE	●	●		●
	PH				
	VISCOSITA'				
T24	ASPETTO			NE	
	COLORE		●		
	ODORE		●		
	PH				
	VISCOSITA'				
T36	ASPETTO			NE	
	COLORE				
	ODORE		NE		
	PH				
	VISCOSITA'				
T48	ASPETTO			NE	
	COLORE				
	ODORE		NE		
	PH				
	VISCOSITA'				
OLTRE SCADENZA	ASPETTO			NE	
	COLORE				
	ODORE				
	PH				
	VISCOSITA'				

Tabella 30 Confronto tra studi di stabilità di fase pre-pilota, pilota e lotti industriali a 30°C ± 2°C, 65% RH ± 5% RH

Dai risultati registrati per i 17 prodotti studiati si evince che le eventuali anomalie sviluppate emergono in studio di stabilità pre-pilota anticipatamente o parallelamente rispetto allo studio della fase pilota e con intensità maggiore o uguale. Questo comportamento è motivato anche dal confronto tra un taglio di laboratorio (pre-pilota) e un taglio industriale (pilota). Inoltre, tra i prodotti analizzati non ci sono casi di anomalie osservate in fase pilota che non siano emerse anche in fase pre-pilota.

Queste considerazioni possono essere interpretate a supporto dello scopo iniziale, ovvero per una possibile revisione dei protocolli inerenti alla stabilità dei cosmetici. Avendo, infatti, dimostrato che gli studi di stabilità su un taglio più piccolo fanno emergere in maniera anticipata, ma quali-quantitativamente uguale eventuali anomalie della formula, si può essere confidenti nell'ipotizzare e proporre per il futuro un piano analitico che anticipi la valutazione della stabilità alla fase di pre-pilota. La proposta consisterebbe nell'integrazione dello studio di stabilità e

compatibilità in pre-pilota; nella prima fase di transizione non si potrà prescindere da una riconferma per la formula pilota per essere certi di intercettare eventuali anomalie esclusive di questo taglio; si proporrà a tal fine una sola stabilità in vetro. A livello pratico questo permetterebbe di ottimizzare diversi aspetti quali risorse, spazi, tempi e materiali e allo stesso tempo di ottenere informazioni funzionali sulla stabilità in una fase precoce di sviluppo, mantenendo inalterata l'efficacia predittiva degli studi di stabilità e compatibilità e non alterando i tempi del processo di sviluppo del prodotto. Questo permetterebbe inoltre di avere più tempo nel caso di necessità di intervento sulla formula.

6 CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati emersi da questo lavoro di tesi si può affermare che i protocolli di studio utilizzati in Unifarco per valutare la stabilità di una nuova formula in sviluppo risultano efficaci ed altamente predittivi della reale shelf-life dei lotti industriali, sia da un punto di vista chimico-fisico che microbiologico. In particolare, è stata validata l'efficacia predittiva dello studio di stabilità condotto in condizione accelerata in fase pilota al fine di definire, dopo i primi tre mesi, la shelf-life dei lotti industriali. Infatti, le anomalie che emergono nel corso dell'analisi in fase pilota compaiono successivamente nello studio di stabilità della fase industriale in modo sovrapponibile sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo.

È stato inoltre confermato che i principali cambiamenti organolettici relativi agli aspetti di colore e odore che si osservano sui prodotti finiti sono imputabili ad alcune materie prime in essi contenute, in particolare profumi ed estratti. Questa correlazione in Azienda veniva considerata come giustificativo per le variazioni organolettiche dei prodotti, essenzialmente sulla base di valutazioni teoriche e conoscenze tecniche sulle materie prime, non essendo tuttavia mai stata provata nella pratica. Questo lavoro lo ha confermato con dati empirici, dimostrando che lo studio di stabilità in condizione di accelerata ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$) sulle materie prime e sui prodotti evidenziano gli stessi cambiamenti qualitativi con entità minore o uguale nelle formule; in queste ultime, infatti, l'azione di stabilizzanti ed antiossidanti riduce l'insorgenza dei fenomeni. Con questo lavoro è stata pertanto evidenziata l'opportunità per il futuro di eseguire uno studio di stabilità sulle nuove materie prime.

I risultati ottenuti hanno inoltre confermato l'efficacia predittiva del challenge test come strumento per valutare la capacità protettiva del sistema conservante contro la contaminazione microbiologica per tutta la shelf-life dei prodotti. Tutte le analisi microbiologiche condotte su lotti industriali in scadenza o scaduti sono infatti risultate conformi ed anche la verifica microbiologica successiva al test in uso, svolto su lotti più recenti, ha confermato l'assenza di contaminazione, ad ulteriore dimostrazione dell'efficacia del sistema conservante, già prevista con il challenge test in fase di sviluppo.

Quanto emerso da questa tesi ha inoltre permesso di ipotizzare un'implementazione dei protocolli di stabilità ed una loro ottimizzazione in termini di contenimento di tempi e costi. È infatti risultato che gli studi di stabilità eseguiti in fase di pre-pilota fanno emergere anomalie sovrapponibili a quelle osservate in fase di pilota, in tempi minori o uguali. Questo consente di valutare un'anticipazione degli studi in fase di pre-pilota, non intaccandone l'efficacia né alterando i tempi di sviluppo, bensì consentendo di intervenire tempestivamente in caso di necessità di riformulazione.

7 BIBLIOGRAFIA

7.1 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Adamska-Szewczyk, A., & Zgórk, G., Plant polyphenols in cosmetics - a review. *European Journal of Medical Technologies*, (2019), 3, 1-10.
- 2) Baccouri, B., & Rajhi, I., Potential antioxidant activity of terpenes. *Terpenes and Terpenoids-Recent Advances*, (2021), 53-62.
- 3) Bonadonna, L., Marletta M (Ed.), Linee guida e metodi per l'analisi microbiologica dei prodotti cosmetici. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013.
- 4) Bylka, W., Matlawska, I., Frański, R., Essential oil composition of *Taraxacum officinale*. *Acta Physiologiae Plantarum*, (2010), 32(2), 231-234.
- 5) Ebrahim, A., DeVore, K., & Fischer, T., Limitations of Accelerated Stability Model Based on the Arrhenius Equation for Shelf Life Estimation of In Vitro Diagnostic Products. *Clinical Chemistry*, (2021), 67(4), 684-688.
- 6) G. D'Agostinis, E.Mignini, *Manuale del Cosmetologo*, 2014, II Edizione, Tecniche Nuove, Milano.
- 7) Halla, N., Fernandes, I.P., Heleno, S.A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A.E., Ferreira, I.C.F.R., Barreiro, M.F., Cosmetics Preservation: A review on present strategies. *Molecules*, (2018), 23(7), 1-41.
- 8) Herman, A., Antimicrobial Ingredients as Preservative Booster and Components of Self-Preserving Cosmetic Products. *Current Microbiology*, (2019), 76(6), 744-754.
- 9) Jaworska, M., Sikora, E., Ogonowski, J., The influence of glicerides oil phase on O/W nanoemulsion formation by pic method. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, (2014), 58, 43-48.

10)Johnson, W., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Gill, L. J., & Heldreth, B., Safety Assessment of Pentaerythrityl Tetra-Di-t-Butyl Hydroxyhydrocinnamate as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, (2018), 37, 80-89.

11)Kirkbride, L., Humphries, L., Kozielska, P., & Curtis, H., Designing a Suitable Stability Protocol in the Face of a Changing Retail Landscape. *Cosmetics*, (2021), 8(3), 64.

12)Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R., Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, (2016), 5.

13)Steinberg, D.C., Preservatives for cosmetics, III ed, 2012.

14)Stepanyuk, A., & Kirschning, A., Synthetic terpenoids in the world of fragrances: Iso E Super® is the showcase. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, (2019), 15, 2590-2602.

7.2 RISORSE ONLINE

1)www.axios-research.com

2)www.chemicalbook.com

3)www.chemspider.com

4)www.magazine.x115.it

5)www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

6)www.q1scientific.com/ich-conditions

7)www.reaxys.com

8)www.salute.gov

9)www.sigmaaldrich.com

10)www.ulprospector.com/en/eu

7.3 NORMATIVA DI RIFERIMENTO

1)Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, 2008, XII Edizione

2)ICH Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and drug products, 2003

3)Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio d'Europa, del 30 novembre 2009, sui prodotti cosmetici.

4)UNI EN ISO 16212. Cosmetici - Microbiologia - Conta di lieviti e muffe. Milano: 2017, Ente Nazionale Italiano di Unificazione.

5)UNI EN ISO 21148. Cosmetici - Microbiologia - Istruzioni generali per l'analisi microbiologica. Milano: 2017, Ente Nazionale Italiano di Unificazione.

6)UNI EN ISO 21149. Cosmetici - Microbiologia - Conta e ricerca dei batteri mesofili aerobi. Milano: 2017, Ente Nazionale Italiano di Unificazione.

7)UNI EN ISO 22716, Cosmetici - Pratiche di buona fabbricazione (GMP). Milano: 2008, Ente Nazionale Italiano di Unificazione.