

# Studi di stabilità di melatonina, resveratrolo e acido L-ascorbico in siero cosmetico per il trattamento delle iperpigmentazioni

Matteo Tutino

## SUMMARY

Stability studies of L-ascorbic acid, melatonin and resveratrol in a cosmetic serum for the treatment of hyperpigmented skin

*Until now it has been difficult to use L-ascorbic acid in cosmetic preparations because of its instability. In this study we used the antioxidant action of melatonin and resveratrol to stabilize L-ascorbic acid. The results of stability tests show that when the three substances are mixed together there is an increase of the L-ascorbic acid stability. The clinical application of the cosmetic serum containing L-ascorbic acid, melatonin and resveratrol promotes re-epithelialization and adjust the color of the hyperpigmented skin.*

KEY WORDS: L-ascorbic acid, melatonin, resveratrol, stability.

Matteo Tutino



## Introduzione

La melatonina è un mediatore neuro endocrino con diverse attività biologiche, ampiamente presente in natura e specialmente nell'acino d'uva<sup>1</sup>. Svolge un attività neuromodulatoria regolando il ritmo sonno veglia; a livello cutaneo regola le funzioni del sistema proopiomelanocortinico, di cui ne fa parte, facendo della pelle un sistema autonomo di difesa contro le *noxe* sia esterne che interne<sup>2-4</sup>. Essa regola anche le funzioni delle cellule di tutto l'organismo agendo sia a livello di membrana, sulla quale trova recettori specifici, che a livello del nucleo, dove giunge attraverso un meccanismo di pinocitosi.

Recentemente è stato dato grande rilievo alla melatonina quale antiossidante ad ampio spettro con un efficace azione antiradicali liberi<sup>4-6</sup>. In questo studio si è voluta utilizzare l'azione antiossidante della melatonina per conferire stabilità alla forma instabile di vitamina C: l'acido L-ascorbico che è l'unica vitamina C ad essere utilizzata a livello biochimico dalla cellula per la

stabilizzazione della prolil idrossilasi ed attivazione conseguente del processo di formazione del collagene attraverso l'idrossilazione di prolina e lisina. In considerazione del fatto che la melatonina è presente nella *vitis vinifera*, per potere ricreare un ambiente antiossidante naturale che aumentasse la stabilità dell'acido L-ascorbico, è stato anche aggiunto resveratrolo in un ambiente costituito da estratto puro di uve rosse (vinaccia).

## Materiali e Metodi

Scopo di questo lavoro è stato lo studio della stabilità di melatonina (M), resveratrolo (R) e acido L-ascorbico (LAA), singolarmente presenti in formulazione, in confronto a una formulazione dove invece si trovano simultaneamente presenti insieme.

Questo studio ha la finalità di esplorare se la melatonina ed il resveratrolo hanno un effetto

stabilizzante sulla vitamina C LAA. In primo luogo è stata definita la concentrazione di acido L-ascorbico, melatonina e resveratrolo solubilizzati nel siero cosmetico attraverso un'analisi quantitativa da cui risultava la concentrazione in soluzione secondo la Tabella 1.

**Tabella 1**

I risultati espressi in % p/p e i relativi valori della deviazione standard (S.D).

	% (p/p) ± S.D.
Acido ascorbico	14.5 ± 0.5
Melatonina	0.28 ± 0.02
Resveratrolo	0.20 ± 0.01

Gli studi di stabilità sono stati condotti a temperatura ambiente (25 °C) e in stufa a 40°C per 55 giorni, e successivamente fino a 125 giorni (4 mesi) (Figure 4, 5, 6).

Sono state analizzate quattro formulazioni, di cui una contenente la miscela dei tre, ovvero, melatonina/acido L-ascorbico/resveratrolo (Mix, secondo la Tabella 1) e tre formulazioni, contenenti ciascuna uno dei tre composti separatamente. Gli eccipienti erano gli stessi nelle 4 formulazioni.

Il metodo utilizzato è il metodo HPLC-DAD, che in condizioni di gradiente ha permesso di ottenere la separazione cromatografica.

Le analisi LC-MS sono state effettuate utilizzando un cromatografo *Jasco PU-1558 (Jasco, Tokio, Giappone)* interfacciato con un detector *UV Jasco UV-1575* operante a 220 nm. I campioni sono stati iniettati utilizzando la valvola di iniezione *Reodyne 7281i* equipaggiata con loop da 20 µL. La separazione cromatografica è stata ottenuta con una colonna *Phenomenex Luna C18, 5 µm (150 × 4.6 mm)*. Le analisi sono state effettuate utilizzando un gradiente binario a flusso 0.4 mL/min.

## Risultati

I risultati di questi studi a 55 e 125 giorni, sono mostrati nei grafici riportati in Figure 1, 2, 3, 4, 5 e 6, dove le percentuali trovate (p/p%) sono messe in grafico rispetto ai giorni di stoccaggio delle formulazioni alle due temperature 25 e 40 °C. In particolare, le percentuali sono state determinate per confronto con lo standard.

Esaminando il grafico riportato in Figura 1, si

può notare che la concentrazione di R (0.20%) in formulazione non cambia significativamente rispetto al Mix, cioè in presenza degli altri due composti M e AA, e non c'è una differenza significativa al variare della temperatura di stoccaggio nel corso di 55 giorni. Sia nel Mix che nella formulazione singola ad ambedue le temperature si assiste ad una variazione del 10%.

La stabilità di M è riportata nel grafico in Figura 2. Non si assiste ad un cambiamento significativo del livello di M in tutti i campioni in questo intervallo di tempo. Da notare che la percentuale di M al tempo zero nel Mix è stata trovata più bassa (0.20%) che nella relativa formulazione a singolo componente (0.28%). Le stesse percentuali sono risultate invariate dopo 55 giorni, previo stoccaggio a 25°C e 40°C.

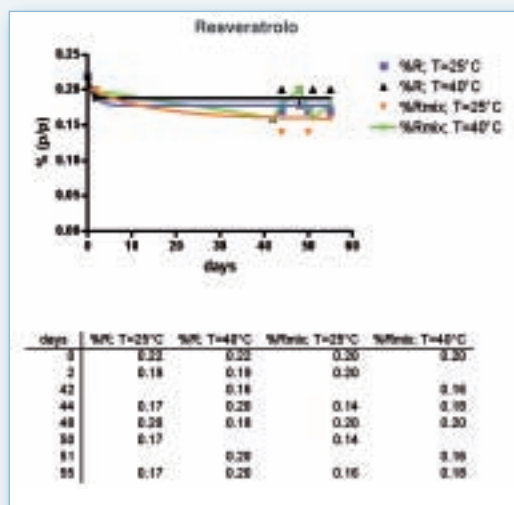
Un calo percentuale significativo si è verificato nel caso di AA (Figura 3) nella formulazione a singolo componente, dove è risultata una diminuzione del 22% a 25°C e del 36% a 40°C. Invece la formulazione contenente tutti e tre gli ingredienti è risultata stabile e la percentuale di AA (14.5%) non ha subito diminuzione significativa.

Questi dati dimostrano che, nel periodo di tempo esaminato, i livelli di AA nel Mix sono mantenuti dalla presenza contemporanea di M e R.

Incoraggiati dai dati di stabilità a 55 giorni, è stata prolungata fino a 125 giorni (4 mesi) la prova da stress sia a temperatura ambientale di 25 gradi che alla temperatura di 40 gradi.

Dai dati che sono emersi dallo stress test condotto per 4 mesi, si può osservare che nella miscela contenente melatonina, resveratrolo e vitamina C

**Figura 1**



(LAA) a 25°C, melatonina ed acido L-ascorbico sono rimasti stabili, mentre il resveratrolo ha subito un calo di circa il 20%. Invece nel mix a 40 °C c'è una degradazione di tutti e tre i componenti: la melatonina va a zero, la vitamina C si riduce del 30% (da 14,5 a 10%) e il resveratrolo perde il 75% (Figure 4, 5 e 6).

## Discussione

Fino ad ora è stato difficile utilizzare l'ac. ascorbico nelle preparazioni cosmetiche per la sua forte instabilità; questo è infatti facile all'ossidazione per l'esposizione alla luce, alla temperatura e all'aria. Questo lavoro stabilisce un punto fermo sull'utilizzo di alcuni regolatori cellulari e di alcuni antiossidanti come la melatonina ed il

resveratrolo per la stabilizzazione dell'acido ascorbico levogiro.

I risultati delle prove di stabilità confermano che quando le tre sostanze si trovano miscelate insieme si determina un aumento della stabilità dell'acido ascorbico. Nelle prove da stress termico risultano essere significativi i primi 55 giorni dove la vitamina C mantiene la propria stabilità assieme alla melatonina e al resveratrolo, anche con temperature che raggiungono i 40 °C.

I risultati sono ancora più incoraggianti dopo 125 giorni quando ad una temperatura di 25 gradi la melatonina e la vitamina C mantengono la loro stabilità mentre il resveratrolo ha un calo solo del 20% (Figure 4, 5, 6) giocando così un ruolo chiave nel mantenimento della stabilità degli altri due componenti nei quattro mesi della prova.

L'azione antiossidante dell'associazione melatoni-

Figura 2

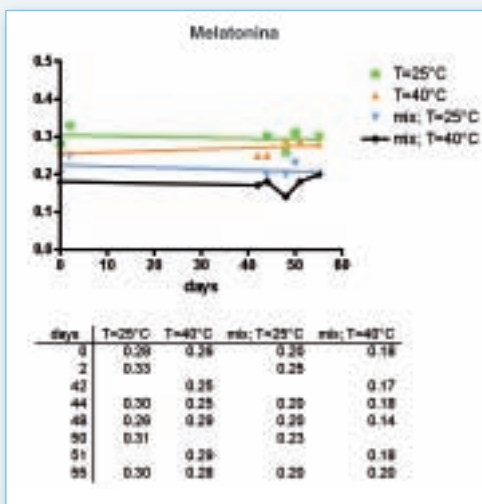


Figura 4

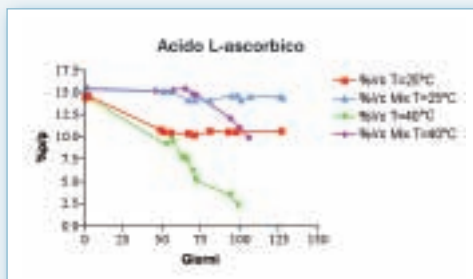


Figura 5

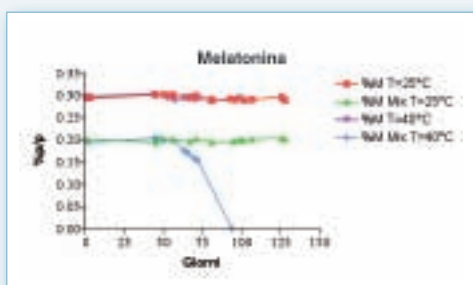


Figura 3

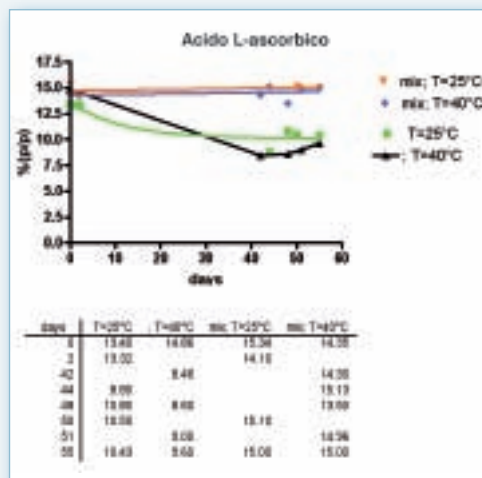
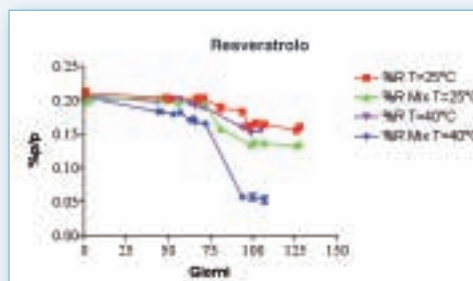


Figura 6



na e resveratrolo nella stabilizzazione della vitamina C levogira è comprovata dal fatto che nello stress test a 40 gradi per 4 mesi la melatonina si ossida fino a ridursi a zero, il resveratrolo si ossida perdendo il 75%, mentre la vitamina C si riduce del 30% mantenendosi nel siero ad una concentrazione del 10%.

L'applicazione clinica di questo siero ha dimostrato che la melatonina non solamente ha un'azione nello stabilizzare l'acido L-ascorbico, congiuntamente al resveratrolo, ma il siero di per sé ha una importante efficacia biologica nell'applicazione clinica sia per l'azione della melatonina, sia per gli effetti della vitamina C e del resveratrolo. Sorprendente risulta il fatto che l'acido ascorbico con la melatonina sembrerebbero

avere un'azione sinergica non solamente nel promuovere la riepitelizzazione e produzione di collagene (Caso clinico 1), ma ancor più sorprendente risulta la regolazione del colore cutaneo (vedi Casi clinici 2, 3 e 4).

## Conclusioni

La vitamina C, LAA, in preparato cosmetico può trovare impiego quando solubilizzata con melatonina e resveratrolo in quanto ne viene aumentata la resistenza all'ossidazione. La stabilità dell'acido ascorbico viene conferita dal sinergismo melatonina/resveratrolo in ambiente costituito da *vitis vinifera*.

## Bibliografia

1. Iriti M, Faoro F. Bioactivity of grape chemicals for human health. *Nat Prod Commun* 2009; 4:611-34.
2. Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab*. 2008; 19:17-24.
3. Slominski A, Wortsman J, Tobin DJ. The cutaneous serotonergic/melatonergic system: securing a place under the sun. *FASEB J*. 2005; 19:176-94.
4. Izykowska I, Piotrowska A, Podhorska-Okolów M, Cegielski M, Zabel M, Dziegiel P. The protective role of melatonin in the course of UV exposure. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2008 Jan 22; 62:23-7.
5. Cutando A, Aneiros-Fernández J, Aneiros-Cachaza J, Arias-Santiago S. Melatonin and cancer: current knowledge and its application to oral cavity tumours. *J Oral Pathol Med*. 2011 Feb 2
6. Kadoma Y, Fujisawa S. Radical-scavenging activity of melatonin, either alone or in combination with vitamin E, ascorbate or 2-mercaptoethanol as co-antioxidants, using the induction period method. *In Vivo*. 2011; 25:49-53.



### Caso clinico 1

Paziente con ferita lacero contusa regione fronto-orbitaria sinistra.  
Trattato con siero contenente acido ascorbico, melatonina e resveratrolo.  
Pre e risultato dopo 14 giorni di trattamento.



**Caso clinico 2**

*Paziente con cicatrici da acne, che ha eseguito applicazione topica 2 volte al giorno con vitamina C, siero contenente melatonina, acido ascorbico e resveratrolo. Da notare l'azione riepitelizzante e stimolante il collagene determinata dal sinergismo dei tre principi attivi.*



**Caso clinico 3**

*Iperpigmentazione perioculare: la paziente ha applicato 2 volte al giorno su contorno occhi 1 goccia del siero cosmetico. Risultato dopo 2 mesi di trattamento. Questo caso dimostra l'azione di regolazione della melatonina sul  $\alpha$ MSH. La melatonina promuove anche un'uniformità nella distribuzione della melanina.*



**Caso clinico 4**

*Trattamento dell'iperpigmentazione con applicazione di 12 gocce 2 volte al giorno. Le gocce vanno distribuite con massaggio energetico su tutto il viso, va eseguita applicazione extra sulle macchie. Pre e risultato dopo 6 mesi di trattamento quotidiano.*