

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

Formulazione e caratterizzazione di preparazioni topiche

contenenti un fitoestratto di canapa industriale

Relatore
Prof.ssa Lorella Giovannelli

Candidato
Camilla Guala

Anno Accademico 2023-24
Sessione autunnale

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

Formulazione e caratterizzazione di preparazioni topiche

contenenti un fitoestratto di canapa industriale

**Relatore
Prof.ssa Lorella Giovannelli**

**Candidato
Camilla Guala**

**Correlatore
Dott.ssa Alice Picco**

**Anno Accademico 2023-24
Sessione autunnale**

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. Il prodotto cosmetico.....	1
1.1. Aspetti normativi.....	1
1.2. Definizione di prodotto cosmetico naturale	1
2. <i>Cannabis Sativa</i> L.	4
3. Normativa relativa al cannabidiolo (CBD) in Italia	6
4. Normativa cosmetica relativa a CBD e THC	8
5. INCI degli ingredienti nei prodotti cosmetici	10
6. Derivati della <i>Cannabis Sativa</i> L. nei prodotti cosmetici in commercio	11
7. Principali funzioni del CBD.....	13
8. Sistema endocannabinoide nella pelle umana.....	15
PARTE SPERIMENTALE	18
SCOPO DEL LAVORO.....	19
STRUMENTI E APPARECCHIATURE	20
MATERIALI.....	21
METODI	29
1. Estratto di canapa industriale.	29
2. Valutazione dell'attività antiossidante dei derivati della <i>Cannabis Sativa</i> L.....	31
3. Preparazione di emulgeli a base di fitoestratto.....	34
4. Caratterizzazione degli emulgeli.....	36
4.1. Caratterizzazione organolettica	36
4.2. Caratterizzazione chimico-fisica	36
4.3. Studio della viscosità.....	36
5. Essiccamento degli emulgeli per <i>spray-drying</i>	39
6. Caratterizzazione delle polveri.....	43
6.1. Caratterizzazione organolettica	43

6.2.	Analisi termogravimetrica (TGA).....	43
6.3.	Proprietà di flusso.....	44
7.	Determinazione del contenuto di CBD e CBDA di emulgeli e polveri	46
8.	Ricostituzione e caratterizzazione dell'emulgel E1	46
9.	Test di stabilità di emulgeli e polveri	47
10.	<i>Panel test</i>	49
RISULTATI E DISCUSSIONE.....		51
1.	Nomenclatura INCI del fitoestratto.....	51
2.	Caratterizzazione delle materie prime.....	51
2.1.	Attività antiossidante di fitoestratto, CBD e CBDA	51
2.2.	Analisi termogravimetrica.....	53
3.	Caratterizzazione degli emulgeli.....	57
3.1.	Caratterizzazione organolettica	57
3.2.	pH.....	58
3.3.	Viscosità.....	59
3.4.	Contenuto di CBD e CBDA	61
4.	Caratterizzazione delle polveri.....	62
4.1.	Caratterizzazione organolettica	62
4.2.	Rese del processo di <i>spray-drying</i>	63
4.3.	Analisi termogravimetrica.....	64
4.4.	Scorrevolezza	65
4.5.	Contenuto di CBD e CBDA	66
5.	Ricostituzione della polvere SDE1	67
6.	Stabilità di emulgeli e polveri	69
6.1.	Emulgeli	69
6.2.	Polveri	72
7.	<i>Panel test</i>	73
CONCLUSIONI.....		75
BIBLIOGRAFIA.....		76

INTRODUZIONE

1. Il prodotto cosmetico

1.1. Aspetti normativi

I cosmetici rappresentano una categoria di prodotti di largo consumo, la cui produzione e commercializzazione è sottoposta a normativa specifica espressa dal Regolamento (CE) 1223/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009.

L'art. 2 del Regolamento definisce “prodotto cosmetico” *qualsiasi sostanza o miscela destinata ad essere applicata sulle superficie 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* [Regolamento (CE) n. 1223/2009].

1.2. Definizione di prodotto cosmetico naturale

La definizione di prodotto cosmetico naturale non è ancora dettata da una normativa. Esistono alcuni enti certificatori che, tramite il rilascio di un certificato in genere indicato sul *packaging* sotto forma di logo, attestano l'origine naturale degli ingredienti del prodotto cosmetico [AIDECO, 2021].

Enti certificatori

- ICEA: Istituto italiano per la Certificazione Etica e Ambientale di prodotti naturali e biologici riconosciuto in tutti i Paesi europei, il cui sigillo è rappresentato in Figura 1. Lo standard seguito da ICEA è quello COSMOS, *Cosmetic Organic Standard*, la normativa unica europea per le certificazioni dei prodotti cosmetici naturali e biologici. La certificazione per il prodotto naturale viene definita *Cosmos Natural* e viene rilasciata dopo il controllo di prodotti cosmetici finiti formulati con ingredienti biologici e/o sostanze chimiche di origine naturale [<https://icea.bio/>].



Figura 1: Sigillo di certificazione ICEA [https://icea.bio].

- CCPB: Consorzio per il Controllo dei Prodotti Biologici, ente certificatore italiano riconosciuto sia dalle autorità nazionali sia da quelle internazionali e il cui sigillo è rappresentato in Figura 2. Nell'ambito cosmetico, CCPB certifica i prodotti come “naturali” e “biologici” secondo due propri standard e secondo NATRUE, lo standard internazionale sulla cosmesi naturale e biologica. La certificazione CCPB prevede il controllo dell'origine naturale e dei metodi di lavorazione sostenibili degli ingredienti di cui è costituito il prodotto cosmetico [https://www.ccpb.it].



Figura 2: Sigillo di certificazione CCPB [https://www.ccpb.it].

- ECOCERT: ente certificatore, il cui sigillo è rappresentato in Figura 3, nato in Francia nel 1991 e attualmente presente in tutto il mondo. In ambito cosmetico, la certificazione ECOCERT implica che il prodotto non contenga ingredienti sintetici come profumi, coloranti, siliconi e oli minerali. ECOCERT segue lo standard COSMOS per l'assegnazione delle proprie certificazioni [https://www.ecocert.com].



Figura 3: Sigillo di certificazione ECOCERT [<https://www.ecocert.com>].

- BDIH: associazione di imprese industriali e commerciali BDIH, l'Associazione federale dell'industria tedesca e del commercio di prodotti farmaceutici, prodotti per la salute, integratori alimentari e per la cura personale, fondata nel 1951. Con sede a Mannheim, in Germania, BDIH è riconosciuto a livello internazionale per la definizione di cosmetico naturale [<https://www.eurobiolab.com>]. Il logo BDIH è rappresentato in Figura 4.



Figura 4: Sigillo di certificazione BDIH [<https://www.eurobiolab.com>].

2. *Cannabis Sativa* L.

La *Cannabis Sativa* L. appartiene alla famiglia delle Cannabaceae, un genere di pianta angiosperma dicotiledone e dioica che comprende un'ampia varietà di piante, accomunate dall'anatomia fogliare distintiva: una struttura a 7 punte con margini seghettati a forma di ventaglio, disposte lungo il fusto principale in modo simmetrico (Figura 5d). In particolare, è una pianta annuale e a crescita rapida costituita da uno stelo che può raggiungere i 4 m e con un diametro compreso tra 1 e 3 cm (Figura 5a). I semi invece, che possono essere lunghi da 2,5 a 3,5 mm e avere un diametro da 2,5 a 3 mm, sono caratterizzati da superficie liscia, forma ovoidale o sferica e di colore grigio (Figura 5c). Ogni seme contiene due cotiledoni ricchi di proteine e olio.

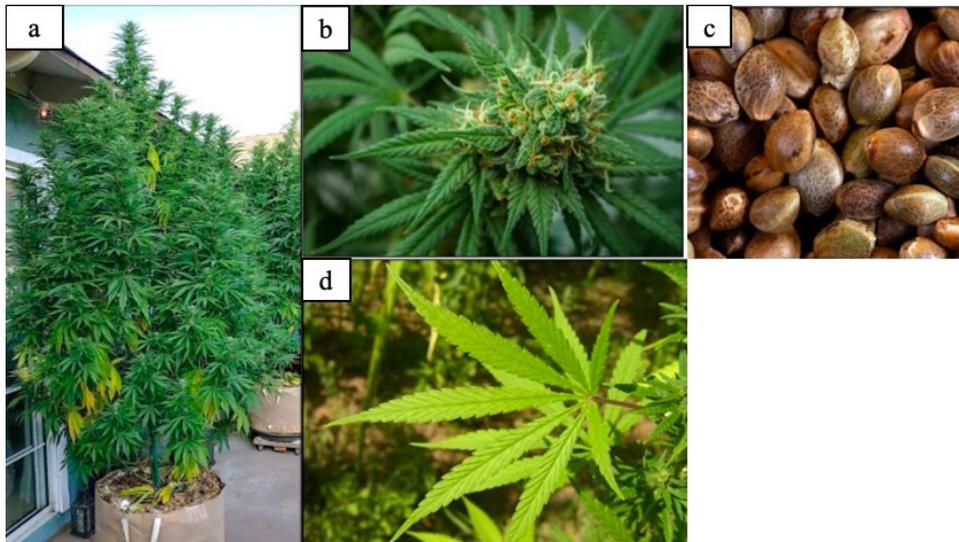


Figura 5: *Cannabis Sativa* L. Aspetto generale della pianta (a); infiorescenza (b); seme (c) e foglia (d) [Hourfane S. et al., 2023, modificata].

I fiori di questa pianta sono caratterizzati da peli ghiandolari che la rendono appiccicosa (Figura 5b). Fino al post-germinazione, le piante maschili non si distinguono da quelle femminili: solo durante l'ultima fase di crescita, grazie alla presenza dei fiori, si ha una determinazione sessuale. I fiori femminili e maschili sono differenti tra loro: quelli femminili non hanno petali e sono costituiti da due stimmi bianchi, gialli o rosa, mentre i fiori maschili hanno cinque sepali di circa 5 mm di lunghezza, con diversi colori, tra cui giallo, bianco o verde [Hourfane S. et al., 2023].

Nelle infiorescenze femminili emergono i tricomi, ghiandole che producono cannabinoidi come il cannabidiolo (CBD) e il delta-9-tetraidrocannabidiolo (THC), mentre le piante maschio sono

dotate di sacche polliniche, sede del materiale genetico necessario per fecondare i fiori femminili [Mnekin L. *et al.*, 2021].

La *Cannabis Sativa* L. è originaria di una regione dell'Asia centrale che si estende dall'Himalaya fino alla Cina nord-occidentale, da dove si è diffusa in quasi tutte le regioni del mondo. Presenta un ciclo di vita annuale ed è più longeva nei climi subtropicali e negli ambienti controllati artificialmente. È molto diffusa in Europa e in America del Nord, dove viene coltivata per essere utilizzata in diversi ambiti, come quello tessile, alimentare, farmacologico e cosmetico [Mnekin L. *et al.*, 2021].

3. Normativa relativa al cannabidiolo (CBD) in Italia

Di seguito viene descritto il percorso normativo recente del cannabidiolo (CBD) in Italia. La Legge 242/2016, che riporta le *“Disposizioni per la promozione della coltivazione e delle filiera agroindustriale della canapa”*, ha permesso di legalizzare la canapa definita *“legale”* o *“light”* per uso industriale [<https://www.gazzettaufficiale.it/>]. È infatti stata approvata la coltivazione della canapa con un tenore di THC inferiore a 0,6% e la sua commercializzazione con THC inferiore a 0,5% [<https://canapamontana.it/>]. Di conseguenza, a gennaio 2019 l'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS) ha raccomandato di rimuovere la cannabis dalla Convenzione unica sugli stupefacenti del 1961, nella quale sono presenti le sostanze *“particolarmente dannose e di valore medico o terapeutico estremamente ridotto”*. La raccomandazione dell'OMS è stata prima presa in considerazione e poi accettata dalla Commissione sugli Stupefacenti (CND), *un organismo di definizione delle politiche nell'ambito del sistema delle Nazioni Unite che guida l'azione internazionale contro le droghe narcotiche”* [<https://temi.camera.it/>; <https://www.politicheantidroga.gov.it/>].

A ottobre 2020 Il Ministero della Salute ha aggiornato il Decreto del Presidente della Repubblica (DPR) del 9 ottobre 1990 n. 309, nel quale sono riportate, in diverse tabelle, le sostanze stupefacenti e psicotrope. Il CBD esclusivamente derivato da estratti di cannabis e destinato a somministrazione orale è stato inserito nella sezione B della Tabella dei Medicinali, Tabella 7 della Farmacopea Ufficiale Italiana [DM 28 ottobre 2020].

Questo decreto è stato sospeso da fine ottobre 2020 fino al 7 agosto 2023, quando il Ministro della Salute Schillaci ne ha annullato la sospensione. Il CBD è quindi rimasto incluso nella sezione B della Tabella dei Medicinali, Tabella 7 della Farmacopea Ufficiale Italiana. Di seguito però, il TAR del Lazio ha sospeso l'annullamento del Ministro della Salute Schillaci fino al 16 gennaio 2023, data successivamente posticipata al 24 settembre 2024 [DM 7 agosto 2023].

Il 27 giugno 2024 è stato emanato un altro Decreto Ministeriale, entrato in vigore il 5 agosto 2024, il quale ignorava il provvedimento del Tar del Lazio che aveva sospeso il Decreto del 2020 [DM 27 giugno 2024]. Di conseguenza il CBD, derivato da estratti di cannabis e destinato alla somministrazione orale, è stato re-inserito nella sezione B della Tabella dei Medicinali, Tabella 7 della Farmacopea Ufficiale Italiana.

Secondo questa variazione normativa, il farmacista può allestire preparazioni con CBD ottenuto da estratto di cannabis e con indicazione per somministrazione orale solo dietro presentazione di ricetta non ripetibile, così come per tutte le preparazioni galeniche allestite con sostanze della sezione B della Tabella dei Medicinali, Tabella 7 della Farmacopea Ufficiale Italiana.

Per quanto riguarda, invece, i prodotti cosmetici contenenti il CBD derivato da estratti di cannabis, la normativa ne vieta la commercializzazione e l'utilizzo [<https://www.salute.gov.it>].

Con una sentenza pubblicata l'11 settembre 2024, il TAR del Lazio ha sospeso il DM 27 giugno 2024. I giudici amministrativi hanno di fatto accolto il ricorso fissando un'udienza di merito per il 16 dicembre 2024 [<https://www.ilsole24ore.com/>].

4. Normativa cosmetica relativa a CBD e THC

In Europa tutti gli ingredienti che possono essere contenuti nei prodotti cosmetici sono riportati in un *database*, denominato *CosIng* (*Cosmetic Ingredient Database*) [<https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/>]. Si tratta di una banca dati che si riferisce a:

- Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009 sui prodotti cosmetici [Regolamento (CE) n. 1223/2009];
- Direttiva 76/768/CEE sui cosmetici [Direttiva 76/768/CEE];
- elenco degli ingredienti cosmetici ai fini dell'etichettatura dei prodotti cosmetici immessi sul mercato (Decisione UE 2019/70);
- pareri sugli ingredienti cosmetici del *Scientific Committee for Consumer Safety* (SCCS).

Di seguito viene illustrato il percorso regolatorio del CBD in ambito cosmetico.

Nell'allegato II del Regolamento (CE) n. 1223/2009 vengono elencate le sostanze vietate nei prodotti cosmetici. Questo allegato proibisce l'uso di narcotici nei cosmetici: sono infatti incluse tutte le sostanze elencate nelle tabelle I e II della Convenzione Unica sugli stupefacenti del 1961, che comprende anche la cannabis [<https://www.politicheantidroga.gov.it/>]. Prima di febbraio 2021, il CBD come ingrediente cosmetico ottenuto da estratti o tinture o resine di cannabis era riportato nell'allegato II del Regolamento 1223/2009 alla voce 306, quindi ritenuto ingrediente vietato nei prodotti cosmetici, anche se non presente nell'elenco delle sostanze stupefacenti della Convenzione Unica sulle sostanze Narcotiche del 1961.

Nel 2019 il *Working Group on Cosmetic Products* della Commissione Europea ha proposto una documentazione che riportava un'interpretazione: poiché il CBD non era, come tale, considerato stupefacente dalla Convenzione del 1961, il CBD sintetico poteva essere ammesso, mentre quello naturale (ottenuto da estratti, tinture o resine di cannabis) restava considerato proibito.

La sentenza della Corte di giustizia dell'Unione europea del 2020 ha precisato che in uno Stato membro non può essere vietata la commercializzazione di CBD, estratto dalla Cannabis Sativa nella sua interezza, prodotto in un altro Stato membro. Pertanto, il CBD non può essere considerato uno "stupefacente" e che, quindi resta soggetto alle norme di libera circolazione

delle merci [Corte di giustizia dell'Unione europea, sentenza nella causa C-663/18, 19 novembre 2020]. Di conseguenza, è stato stabilito che il CBD non doveva essere considerato stupefacente ai sensi della Convenzione del 1961, anche se estratto dall'intera pianta di canapa. Il CBD non esercita infatti effetti psicoattivi riconosciuti dalla letteratura scientifica.

A seguito di questa sentenza e della presa posizione da parte del consorzio dell'industria di trasformazione della canapa (EIHA, *European Industrial Hemp Association*), si è ottenuta l'eliminazione del divieto della *Cannabis Sativa* L. (II/306) e l'inserimento del CBD nel *CosIng*.

In particolare, l'aggiornamento del *database CosIng* ha introdotto una voce specifica per il CBD derivato da estratto, tintura o resina di cannabis.

Questo inserimento ha consentito l'impiego nell'Unione Europea del CBD di derivazione naturale nei prodotti cosmetici, segnando un importante passo avanti per l'industria cosmetica europea e aprendo nuove opportunità per l'uso degli ingredienti derivati dalla canapa, mentre il CBD di sintesi si poteva già utilizzare come ingrediente cosmetico.

Ad oggi sono riportate 41 diverse registrazioni di *Cannabis Sativa* L. tra le quali: CANNABIDIOL, CANNABIS SATIVA SEED OIL e CANNABIS SATIVA SEED EXTRACT [Ternelli M., 2021].

Per quanto riguarda il THC, sostanza psicoattiva che solitamente si trova nei fiori *Cannabis Sativa* L., è regolamentato a livello internazionale come stupefacente, con specifiche normative che ne limitano la concentrazione nei prodotti derivati dalla cannabis. Secondo l'Allegato II del Regolamento (CE) n. 1223/2009 (II/306), le materie prime derivate dalla cannabis utilizzate nei cosmetici devono avere un contenuto di THC inferiore a 0,2% [Regolamento (CE) n. 1223/2009 (II/306)].

5. INCI degli ingredienti nei prodotti cosmetici

Come descritto precedentemente, gli ingredienti che possono essere utilizzati in un prodotto cosmetico sono riportati nel Regolamento CE n. 1223/2009.

In particolare, l'articolo 19 del Regolamento prevede che le etichette dei prodotti cosmetici debbano riportare l'elenco degli ingredienti di cui sono costituiti, e tali ingredienti devono avere una denominazione comune [Regolamento (CE) n. 1223/2009].

Nel 1996 nella Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea è stato pubblicato l'inventario europeo degli ingredienti cosmetici (INCI, *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) [Gazzetta Ufficiale L. 132, 1/6/1996]. All'interno dell'Unione Europea e in molti altri Paesi, come per esempio Stati Uniti, Russia, Brasile e Canada, sull'etichetta di ogni prodotto cosmetico devono essere riportati gli ingredienti con la nomenclatura comune denominata INCI. L'INCI viene aggiornato periodicamente dalla Commissione europea. L'elenco degli ingredienti espressi sull'etichetta con designazione INCI viene preceduto dal termine *ingredients*. Inoltre, gli ingredienti devono essere indicati in ordine decrescente di peso tranne per quelli presenti in quantità inferiore all'1%, i quali possono essere indicati in ordine sparso [Penazzi G., 2020].

Il *Personal Care Products Council* (PCPC), fondato nel 1894, è la principale associazione che rappresenta le aziende cosmetiche in ambito commerciale, scientifico, normativo e legislativo. Il PCPC si occupa di pubblicare i nomi INCI, sviluppati dall'*International Nomenclature Committee* (INC), nell'*International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook* (wINCI, disponibile online) [<https://www.personalcarecouncil.org/>].

Il Comitato internazionale per la nomenclatura impiega circa tre mesi per l'assegnazione di un nome INCI dopo la presentazione della domanda, la quale può essere richiesta esclusivamente per via elettronica.

Dopo aver ottenuto l'INCI, tutti gli ingredienti che possono essere contenuti nei cosmetici in Europa sono riportati nel *Cosing*, oltre che su wINCI.

Quindi, per identificare un ingrediente nei prodotti cosmetici, è necessario che abbia un nome INCI, ma questo non significa che l'ingrediente sia stato approvato per l'impiego in un prodotto cosmetico, così come nel caso in cui un ingrediente non abbia il nome INCI non è detto che non possa essere usato, in quanto la sicurezza e l'idoneità sull'utilizzo dell'ingrediente devono

essere valutate dal produttore prima della commercializzazione del prodotto con la compilazione del *Product Information File* (PIF).

6. Derivati della *Cannabis Sativa* L. nei prodotti cosmetici in commercio

Con l’inserimento nel 2021 del CBD ottenuto da estratti o tinture o resine di cannabis all’interno del *CosIng*, si è registrato un aumento nello sviluppo di cosmetici a base di questa sostanza. Tra il 2020 e il 2024 per il settore della *CBD-Beauty* sono previste stime di crescita annua del 31% [Torriani M., 2022]. L’interesse del mercato nei confronti del CBD, a cui vengono attribuite numerose proprietà biologiche (per esempio antinfiammatorie, antiossidanti e antirughe), è in linea con la crescente attenzione dei consumatori per gli ingredienti naturali [Torriani M., 2022].

Da una ricerca effettuata impostando le parole chiave “CBD cosmetics” sul portale *PubMed*, banca dati biomedica, è emerso che il numero di articoli scientifici pubblicati negli ultimi 25 anni è in forte aumento (Figura 6).



Figura 6: Numero di articoli presenti su PubMed con “CBD cosmetics” impostato come parametro di ricerca [PubMed, consultazione del 12 settembre, 2024].

Dalla ricerca bibliografica risulta che i seguenti ingredienti sono presenti in diverse tipologie di prodotti, come quelli per capelli, per viso e corpo: *CANNABIS SATIVA SEED OIL*, *CANNABIS SATIVA SEED EXTRACT*, *CANNABIS SATIVA FLOWER/LEAF/STEM EXTRACT*, *CANNABIS SATIVA SEED WATER*, *CANNABIDIOL - SYNTHETICALLY PRODUCED* E *CANNABIDIOL - DERIVED FROM EXTRACT OR TINCTURE OR RESIN OF CANNABIS*. L'analisi dei risultati della ricerca dei prodotti cosmetici già presenti in commercio contenenti derivati della *Cannabis Sativa* L. sono riportati nella Tabella 1 [<https://incibeauty.com/it>; <https://ec.europa.eu/>].

Tabella 1: Derivati della Cannabis Sativa L. nei prodotti cosmetici in commercio e loro funzioni.

Nome INCI	Funzione	Prodotti cosmetici
<i>CANNABIS SATIVA SEED OIL</i>	- condizionante cutaneo - emolliente	shampoo, oli idratanti, creme e balsami labbra
<i>CANNABIS SATIVA SEED EXTRACT</i>	- condizionante cutaneo - emolliente	shampoo e creme idratanti
<i>CANNABIS SATIVA FLOWER/LEAF/STEM EXTRACT</i>	- condizionante cutaneo - emolliente - antiossidante - antiseborroico - protettivo cutaneo	creme, oli idratanti, balsami labbra, gel doccia e maschere detossificanti
<i>CANNABIS SATIVA SEED WATER</i>	- condizionante cutaneo - emolliente - condizionante per capelli	shampoo, balsami, detergenti purificanti e creme idratanti
<i>CANNABIDIOL - SYNTHETICALLY PRODUCED</i>	- condizionante cutaneo - emolliente - antiossidante - antiseborroico - protettivo cutaneo	creme idratanti, antiossidanti e antirughe, oli idratanti e balsami labbra
<i>CANNABIDIOL - DERIVED FROM EXTRACT OR TINCTURE OR RESIN OF CANNABIS</i>	- condizionante cutaneo - emolliente - antiossidante - antiseborroico - protettivo cutaneo	creme idratanti, antiossidanti e antirughe

7. Principali funzioni del CBD

I cannabinoidi, gruppo di sostanze derivate dalla *Cannabis Sativa* L., possono essere suddivisi in tre classi (Tabella 2): gli endocannabinoidi, ovvero cannabinoidi prodotti dal corpo umano, i fitocannabinoidi, di derivazione vegetale dalla cannabis, e i cannabinoidi sintetici [Yoo E. H. *et al.*, 2023].

Tabella 2: Classi di cannabinoidi [Yoo E.H. *et al.*, 2023, modificata].

Tipologia di cannabinoidi	Costituenti
Endocannabinoidi	Palmitoiletanolamide (PEA)
	Anandamide (AEA) o N-arachidonoiletanolamina
	2-arachidonoil-glicerolo (2-AG)
Fitocannabinoidi	Acido cannabigerolico (CBGA)
	$\Delta(9)$ -Tetraidrocannabinolo (THC)
	Acido tetraidrocannabinolico (THCA)
	Cannabidiolo (CBD) Acido cannabidiolico (CBDA)
	Cannabigerolo (CBG)
	Cannabicromene (CBC)
	Cannabigerovarina (CBGV)
	Cannabinolo (CBN) Acido cannabinolico (CBNA)
Cannabinoidi sintetici	WIN55.212-2
	JTE-907

Il fitocannabinoide più utilizzato in ambito cosmetico è il CBD.

Tra le sue molteplici funzioni del CBD si riportano quelle antiepilettiche, ansiolitiche, antipsicotiche, antinfiammatorie [Peng J. *et al.*, 2022], antiossidanti, antirosinasiche e antielastasiche [Guy C. J. *et al.*, 2023] legate all'azione su diversi tipi di recettori. In Tabella 3 sono state riportate le principali funzioni del CBD in base al recettore su cui agisce.

Tabella 3: Principali recettori e funzioni del CBD.

Recettori	Funzioni del CBD
CB1*	agonista debole e modulatore allosterico negativo, permette la regolazione del dolore, dell'inflammatione in vari organi periferici e la produzione di citochine pro-inflammatorie nei cheratinociti proteggendo la barriera cutanea
CB2*	agonista debole e potenziale agonista inverso del recettore, l'attivazione di questo recettore riduce lo stress ossidativo e l'inflammatione
TRP*, soprattutto TRPV1*	agonista, contribuisce all'effetto antinfiammatorio e antiossidante
PPAR γ *	agonista, regolazione della trascrizione genica associata all'inflammatione e allo stress ossidativo
GPR55 (recettore accoppiato a proteine G55)	antagonista, effetto anticonvulsivante
5-HT1A (recettore 5-idrossitriptamina 1A)	agonista, modulazione dell'inflammatione, dello stress ossidativo e delle risposte comportamentali allo stress.
Adenosina A1	agonista, effetti antinfiammatori e antiaritmici
MOR (recettori oppioidi μ)	modulazione allosterica negativa, importante per il controllo dell'abuso di oppioidi
Canali del sodio e del calcio	effetto inibitorio sul potenziale elettrico di membrana, quindi utile come potenziale terapia per il trattamento dell'epilessia

*Gli acronimi dei recettori sono spiegati nel testo.

8. Sistema endocannabinoide nella pelle umana

“Il sistema endocannabinoide, composto da endocannabinoidi, recettori ed enzimi responsabili della sintesi e della degradazione degli endocannabinoidi” [Yoo E.H. *et al.*, 2023], svolge un ruolo cruciale nell'omeostasi della pelle: la disregolazione di tale sistema è infatti associata a malattie dermatologiche. I principali endocannabinoidi, il 2-arachidonoil-glicerolo e l'anandamide, si legano ai recettori dei cannabinoidi CB1 (recettore cannabinoide tipo 1) e CB2 (recettore cannabinoide tipo 2), il primo predominante nel sistema nervoso centrale e il secondo nel sistema nervoso periferico. Entrambi i recettori sono presenti in cheratinociti, mastociti, follicoli piliferi e fibre nervose della pelle [Yoo E.H. *et al.*, 2023].

Gli endocannabinoidi attraverso l'interazione con i recettori CB1 e CB2 espressi nei cheratinociti svolgono funzioni molto importanti tra cui l'inibizione della proliferazione cellulare e del rilascio dei mediatori infiammatori e l'induzione della differenziazione e dei processi apoptotici. Di conseguenza, attraverso i recettori CB1 e CB2, gli endocannabinoidi modulano negativamente le risposte infiammatorie delle cellule immunitarie presenti nella pelle. Un altro aspetto riguardante l'interazione con CB1, espresso sui nervi sensoriali afferenti, è l'inibizione del dolore e prurito [Birò T. *et al.*, 2009].

Per quanto riguarda il follicolo pilifero, l'anandamide attiva il recettore CB1: questo comporta una riduzione della crescita del fusto del capello, mentre nei sebociti con l'attivazione del recettore CB2 della ghiandola sebacea l'anandamide promuove la sintesi lipidica e l'apoptosi [Birò T. *et al.*, 2009].

Gli endocannabinoidi si legano anche ai recettori-canale TRP (*transient receptor potential*), coinvolti nella percezione del prurito, temperatura e dolore [De Amelia D. L. *et al.*, 2020]. Nello specifico, l'anandamide è un agonista del recettore TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*), mentre il THC interagisce con il recettore TRPV2 (*transient receptor potential vanilloid 2*) [Sideris *et al.*, 2024]. Di particolare importanza anche il recettore PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), che interagisce con i cannabinoidi regolando così il metabolismo dei lipidi, del glucosio e il processo di infiammazione [Atalay S. *et al.*, 2019]. I fitocannabinoidi, composti naturali sintetizzati nei tricomi ghiandolari di *Cannabis Sativa* L., agiscono come ligandi esogeni del sistema endocannabinoide, inoltre come i cannabinoidi interagiscono anche con gli altri recettori citati precedentemente [Mnekin L. *et al.*, 2021].

L'aspetto di una persona può essere compromesso da fattori esogeni (come radiazioni ultraviolette, particelle di polvere e farmaci) ed endogeni (come ischemia, processi metabolici e ormoni) che possono causare infezioni cutanee. La risposta a questi fattori è la produzione di stress ossidativo, attivando il sistema immunitario e in particolare i macrofagi, ovvero cellule del sistema immunitario altamente specializzate, che a loro volta attivano il fattore nucleare NF- κ B, un complesso proteico attivo come fattore di trascrizione di molecole pro-infiammatorie. L'eccessiva attivazione del sistema immunitario può causare problemi cutanei come dermatite, acne e secchezza della pelle. Lo stress ossidativo porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che possono danneggiare il DNA, contribuendo all'invecchiamento cutaneo e all'apoptosi dei fibroblasti [Xuelian C. *et al.*, 2023].

I ROS promuovono l'espressione della proteina attivatrice 1 (AP-1) e delle chinasi proteiche attivate da un fattore extracellulare che induce proliferazione cellulare (MAPK), le quali a loro volta inducono l'espressione di metalloproteinasi della matrice (MMP) responsabili della decomposizione della matrice extracellulare (ECM) come collagene, elastina e fibronectina. Di conseguenza si verifica perdita di elasticità della pelle. Inoltre, i ROS degradano il collagene e ne inibiscono la produzione, accelerando la senescenza dei fibroblasti [Xuelian C. *et al.*, 2023]. È stato dimostrato che il CBD può migliorare le attività degli enzimi antiossidanti come la glutatione perossidasi (GSH-Px) e la superossido dismutasi (SOD), riducendo il contenuto di ROS [Dawidowicz, A. L. *et al.*, 2021].

In letteratura è stato dimostrato che i cannabinoidi CBG, CBD, Δ 9-THC, CBN, CBGA CBDA e Δ 9-THCA hanno un'attività antiossidante, grazie alla loro capacità di neutralizzare i radicali liberi. Sebbene l'intensità di queste attività per i singoli cannabinoidi non sia la stessa, è paragonabile a quella della vitamina E [Xuelian C. *et al.*, 2023].

La forma non decarbossilata del cannabidiolo è l'acido cannabidiolico (CBDA) [Peng J. *et al.*, 2022], un fitocannabinoide non psicotropo che durante il ciclo di vita della pianta va spontaneamente incontro a decarbossilazione non enzimatica a seguito di esposizione alla luce e al calore. Quindi, a causa di questa sua instabilità, il CBDA come tale ha trovato dei limiti di impiego e le sue proprietà sono state meno studiate rispetto ai composti neutri come THC, CBD e CBG [Rock *et al.*, 2021].

Il cannabigerolo (CBG) è un fitocannabinoide non psicotropo presente in piccole quantità nella *Cannabis Sativa* L. (meno dell'1% del peso secco); agisce come precursore del CBD e del THC.

A causa della sua ridotta concentrazione, l'estrazione del CBG dalla pianta è piuttosto complessa e costosa [Perez E. *et al.*, 2022].

A differenza del CBD, ampiamente studiato e noto per le sue proprietà biologiche, il CBG è meno caratterizzato ma mostra promettenti proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. Dagli studi *in vitro* è stato dimostrato che il CBG regola un numero maggiore di geni rispetto al CBD, tra cui quelli coinvolti nella produzione di collagene e nella risposta infiammatoria; inoltre, come il CBD, è in grado di svolgere azione antiossidante in colture di fibroblasti dermici [Perez E. *et al.*, 2022].

Un esempio di studio *in vivo* dell'efficacia clinica del CBG ha coinvolto 20 volontari con pelle irritata che, a seguito dell'applicazione di un siero contenente lo 0,1% di CBG si è verificata una riduzione significativa della perdita di acqua transepidermica e del rossore, rispetto al placebo [Perez E. *et al.*, 2022].

La TEWL è un fenomeno fisiologico secondo cui l'acqua diffonde ed evapora continuamente attraverso gli strati esterni della pelle. Gli strati esterni della cute hanno il compito di trattenere l'acqua all'interno del corpo, ma una piccola quantità riesce a passare, mantenendo vitale e idratata la pelle e contribuendo alla termoregolazione. La misurazione della TEWL può quindi essere indice dell'efficienza della barriera cutanea. Anche questo risultato suggerisce il potenziale del CBG come un candidato promettente per applicazioni dermatologiche [Perez E. *et al.*, 2022].

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DEL LAVORO

Nel 2021 il CBD ottenuto da estratti o tinture o resine di cannabis è stato inserito nel *CosIng*, banca dati degli ingredienti cosmetici. A questo cannabinoide non psicoattivo, del quale sono riportate in letteratura numerose attività, tra le quali quella antiossidante, è stato quindi assegnato ufficialmente un INCI, ovvero la nomenclatura internazionale degli ingredienti cosmetici.

In questa tesi sono stati formulati emulgeli a base di un estratto ottenuto da infiorescenze di canapa industriale, costituito principalmente da CBD e CBDA. Da studi *in vitro* condotti nello stesso laboratorio in cui si è svolto questo lavoro [Grassi L., 2024], è emerso che questo fitoestratto è adatto per la formulazione di preparazioni per l'applicazione cutanea dei cannabinoidi non psicoattivi CBD e CBDA. Dopo aver valutato l'attività antiossidante del fitoestratto e averla confrontata con quella di CBD e CBDA come tali, sono stati formulati quattro emulgeli contenenti il fitoestratto incorporato in una fase oleosa costituita da uno dei seguenti ingredienti: olio di semi di canapa, olio di nocciolo di albicocca, olio di nocciolo di pesca e un prodotto di scarto derivante dal processo estrattivo della cannabis. Come ingrediente emulsionante-gelificante è stata utilizzata una miscela di ingredienti di origine naturale: gomma xantana, sodio stearoil lattilato, amido di tapioca e alginato di sodio.

Sono stati inoltre formulati quattro emulgeli di riferimento privi di fitoestratto.

Tutti gli emulgeli sono stati caratterizzati dal punto di vista organolettico, chimico-fisico e tecnologico e successivamente sono stati convertiti in polvere mediante processo di *spray-drying*. È stata effettuata la caratterizzazione anche delle polveri preparate a partire dagli emulgeli e dell'emulgel ottenuto per ricostituzione con acqua di una delle polveri a base di fitoestratto.

Dell'emulgel formulato con fitoestratto e olio di semi di canapa, dopo l'aggiunta di fragranze, è stata condotta una valutazione sensoriale su 23 volontari (*panel test*).

STRUMENTI E APPARECCHIATURE

- Bilancia analitica, modello BP510S, Sartorius.
- Bilancia analitica, modello XR 205SM-DR, Precisa.
- Bagnomaria, modello WTB 6, MEMMERT.
- Omogeneizzatore Ultra-Turrax[®] T25, IKA, utensile di dispersione S25N-10G.
- Viscosimetro rotazionale DV-II+, Brookfield Engineering Laboratories, Inc.
- pH-metro: modello SevenCompact S230, METTLER TOLEDO.
- Miscelatore centrifugo planetario, modello ARE-250, Thinky Corporation.
- Camera climatica, modello HPP110, MEMMERT.
- Termogravimetro TGA 4000, Perkin Elmer.
- *Spray-Dryer*: Mini *Spray-Dryer*, modello B-290, BÜCHI.
- Sistema HPLC, SHIMADZU
2 Pompe: LC – 10 AD Vp
Controller: SCL – 10 A Vp
Campionatore automatico: SIL-10 AD Vp
Degasatore: DGU-14-A
Rivelatore a matrice di fotodiodi SPD-M10A Vp
Colonna: Thermo Synchronis aQ C18, 150 mm × 4,6 mm, (5 µm) protetta con un SecurityGuard[®] (Phenomenex).
- Spettrometro di massa Q-Exactive Plus UHMR Hybrid Quadrupole Orbitrap[™] dotato di un sistema UHPLC Vanquish[™] Duo (Waltham, MA, USA) e una sorgente elettrospray (ESI) pH-metro: modello SevenCompact S230, METTLER TOLEDO.
- Lettore di micropiastre Perkin Elmer VICTOR[®] Nivo.
- Fotocamera Lumix DMC-FZ300 (1080p HD, 240 fps), Panasonic.
- Agitatore ad asta RW 16, IKA.

MATERIALI

ESTRATTO DI CANAPA – Laboratorio chimico Extracta Srl

Si tratta di un estratto di canapa industriale fornito come purificato, non distillato, *winterizzato* e purificato da clorofilla e THC.

Caratteristiche organolettiche: si presenta come una resina densa di colore giallo-arancio (Figura 7), con odore caratteristico [Cuadari A., 2023].

L'estratto è stato conservato in un contenitore ermetico, posto al riparo dalla luce e in frigorifero (4 °C).



Figura 7: Estratto di canapa.

OLIO DI SEMI DI CANAPA (OdC) – Aroma-Zone

Numero CAS: 89958-21-4

Densità: 0,850-0,950 g/mL

Denominazione INCI: CANNABIS SATIVA SEED OIL

Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà: l'olio di semi di canapa è un ingrediente cosmetico naturale ottenuto dalla spremitura a freddo dei semi della *Cannabis sativa* L., appartenente alla famiglia delle Cannabaceae. È un olio vergine, non sottoposto ad alcun trattamento chimico [McMullen R.L. *et al.*, 2024].

Caratteristiche organolettiche: fluido di colorazione giallo-ocra con una profumazione che ricorda la frutta secca. Grazie alle sue proprietà nutrienti, emollienti, elasticizzanti cutanee e

calmanti, l'olio di semi di canapa è largamente utilizzato per realizzare dei prodotti cosmetici non unti al tatto.

Questo olio viene utilizzato anche in ambito alimentare, essendo ricco di nutrienti fondamentali come l'acido α -linolenico, acido grasso della serie omega-3 che può essere assunto solo ed esclusivamente con l'alimentazione.

OLIO DI NOCCIOLO DI ALBICOCCA (OdA) – Farmalabor

Numero CAS: 72869-69-3

Densità: 0,910-0,920 g/mL

Denominazione INCI: PRUNUS ARMENIACA KERNEL OIL

Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà: l'olio di semi di canapa è un ingrediente cosmetico naturale ottenuto dalla spremitura a freddo dei noccioli ricchi, in particolare di acido oleico, acido linoleico, acido palmitico e vitamina A e E [Lee H. *et al.*, 2014].

Caratteristiche organolettiche: fluido dal colore giallino con una profumazione abbastanza neutra.

Grazie alla sua composizione è noto per le proprietà nutrienti, emollienti e tonificanti nei confronti della pelle: contrasta l'invecchiamento cutaneo, rinforza il film idrolipidico e contribuisce a rendere la pelle più elastica.

OLIO DI NOCCIOLO DI PESCA (OdC) – Farmalabor

Numero CAS: 8002-78-6

Densità: 0,906-0,922 g/mL

Denominazione INCI: PRUNUS PERSICA KERNEL OIL

Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà: l'olio di nocciolo di pesca è un prezioso estratto ricco di nutrienti e sostanze benefiche per la pelle e i capelli. Fluido dal colore giallino con una profumazione lievemente mandorlata. Grazie alla sua composizione ricca di acidi grassi come l'acido oleico, l'acido linoleico, l'acido palmitico e l'acido α -linoleico, offre una serie di vantaggi per la cura della pelle.

Le sue proprietà emollienti lo rendono ideale per trattare la pelle sensibile, riducendo le desquamazioni e nutrendo le pelli disidratate. Gli acidi grassi insaturi presenti, come l'acido α -linoleico, contribuiscono a mantenere la pelle morbida ed elastica, garantendo un'idratazione ottimale.

Grazie alla sua azione antiossidante conferita dalla vitamina E presente, l'olio di nocciolo di pesca contrasta l'azione dei radicali liberi, proteggendo le cellule della pelle dall'ossidazione e prevenendo così l'invecchiamento precoce [<https://incibeauty.com/>].

INSTATHIX® – Safic-Alcan

Denominazione INCI: XANTHAN GUM, SODIUM STEAROYL LACTYLATE, TAPIOCA STARCH, ALGIN

Emulsionante, addensante, stabilizzante ed esaltatore di *texture*, viene utilizzato in percentuali comprese tra il 2% e il 30% per realizzare emulsioni olio-in-gel.

Si presenta come polvere bianca facilmente disperdibile. Utilizzato in cosmetica per ottenere prodotti con *texture* piacevole, non appiccicosa e di facile assorbimento con un aspetto satinato opaco che richiama la sensazione data dall'applicazione di un elastomero siliconico.

Prodotto di origine naturale approvato da COSMOS, uno standard che certifica materie prime ad uso cosmetico e prodotti finiti formulati con l'impiego di ingredienti biologici e/o sostanze chimiche di origine naturale [Safic-Alcan, 2023].

RESIDUO WINTERIZZATO (Wint) – Laboratorio chimico Extracta Srl

Prodotto ottenuto dal processo di *winterizzazione* del fitoestratto utilizzato in questo lavoro.

Caratteristiche chimico-fisiche: prodotto solido di colore marrone scuro con odore caratteristico della pianta (Figura 8).



Figura 8: Residuo ottenuto per winterizzazione dell'estratto di canapa industriale.

CANNABIDILOLO (CBD) – Laboratorio chimico Extracta Srl

Denominazione INCI: CANNABIDIOL

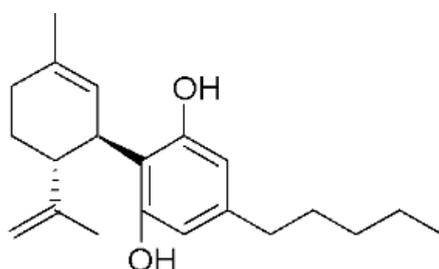
Cannabinoide non psicoattivo

Formula molecolare: $C_{21}H_{30}O_2$

Peso molecolare: 314,47 g/mol

Solubilità: buona in oli e solventi organici, molto bassa in acqua (circa 0,10 $\mu\text{g/mL}$) [Vanti G. *et al.*, 2021].

Aspetto: polvere di colore bianco e inodore.



ACIDO CANNABIDIOLICO (CBDA) – Laboratorio chimico Extracta Srl

Denominazione INCI: CANNABIDIOLIC ACID

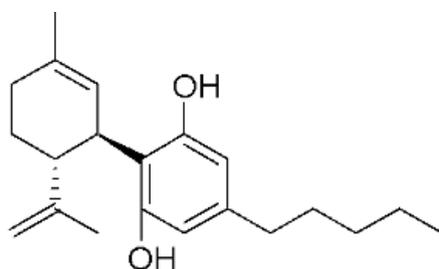
Cannabinoide non psicoattivo

Formula molecolare: $C_{22}H_{30}O_4$

Peso molecolare: 358,48 g/mol

Solubilità: buona in solventi organici e in acqua [Formato M. *et al.*, 2020].

Aspetto: polvere di colore bianco e inodore.



METANOLO – Honeywell Riedel-de Haën™

Formula molecolare: CH₄O

Grado di purezza: 99,9%

Peso molecolare: 32,04 g/mol

Densità: 0,792 g/mL

Temperatura di ebollizione: 64,7 °C

Aspetto: si presenta come un liquido incolore dall'odore caratteristico. È molto volatile ed estremamente infiammabile.

DPPH[•] (radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazil) – Merk

Formula molecolare: C₁₈H₇N₅O₆

Peso molecolare: 394,33 g/mol

Caratteristiche: è una polvere cristallina di colore viola scuro.

Funzioni: viene impiegato per la determinazione dell'attività antiossidante mediante analisi spettrofotometrica.

(R)-(+)-LIMONENE – Tokyo Chemical Industry (TCI)

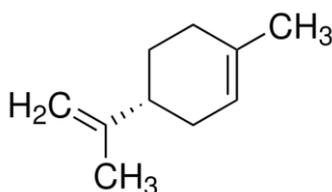
Denominazione INCI: D-LIMONENE

Numero CAS: 5989-27-5

Formula bruta: C₁₀H₁₆

PESO MOLECOLARE: 136,24 g/mol

Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà: appartiene alla classe dei monoterpeni; si presenta come un liquido incolore con odore caratteristico di limone, ha solubilità in acqua di circa 5 mg/L e tensione di vapore di 200 Pa a 24,85 °C [Sakamoto K. *et al.*, 2017].



GERANIOLO – Tokyo Chemical Industry (TCI)

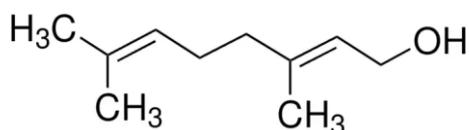
Denominazione INCI: GERANIOL

Numero CAS: 106-24-1

Formula bruta: C₁₀H₁₈O

PESO MOLECOLARE: 154,25 g/mol

Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà: appartiene alla classe dei monoterpeni aciclici; si presenta come un liquido incolore con odore caratteristico floreale; è solubile in etanolo [https://incibeauty.com/].



FENILETIL ALCOOL – Sigma-Aldrich

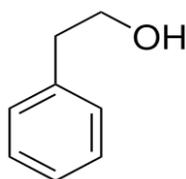
Denominazione INCI: PHENETHYL ALCOHOL

Numero CAS: 60-12-8

Formula bruta: C₈H₁₀O

PESO MOLECOLARE: 112,16 g/mol

Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà: si presenta come un liquido incolore con odore caratteristico floreale; è solubile in acqua ed etanolo.



EUCALIPTOLO – ARDET S.r.l

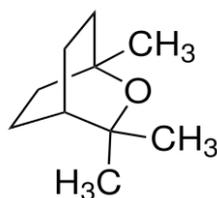
Denominazione INCI: EUCALYPTUS GLOBULUS LEAF OIL

Numero CAS: 470-8-2-6

Formula bruta: C₁₀H₁₈O

PESO MOLECOLARE: 154,25 g/mol

Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà: appartiene alla classe dei monoterpeni; è un etere ciclico, si presenta come un liquido incolore con odore caratteristico di menta.



BETA-PINENE – Sigma-Aldrich

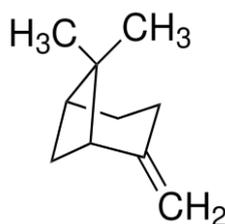
Denominazione INCI: BETA-PINENE

Numero CAS: 127-91-3

Formula bruta: C₁₀H₁₆

PESO MOLECOLARE: 136,24 g/mol

Caratteristiche chimico-fisiche e proprietà: appartiene alla classe dei monoterpeni ciclici; si presenta come un liquido incolore con odore caratteristico fresco e legnoso; è solubile in etanolo e insolubile in acqua e ha tensione di vapore di 500 Pa a 25 °C [Sakamoto K. *et al.*, 2017].



AROMA ALIMENTARE NATURALE FRAGOLA BIO – Aroma-Zone

Denominazione INCI: PARFUM

Caratteristiche chimico-fisiche: aroma naturale di fragola (incluso estratto di fragola BIO) su base alcolica biologica; è un fluido di colorazione rosa, di densità 0,99 g/mL e profumazione caratteristica.

ESTRATTO AROMATICO NATURALE DI VANIGLIA BIO – Aroma-Zone

Denominazione INCI: SACCHARUM OFFICINARUM EXTRACT AND VANIGLIA PLANIFOLIA EXTRACT AND ALCOOL

Caratteristiche chimico-fisiche: estratto di vaniglia naturale biologico su supporto di alcool biologico e zucchero. Si tratta di un liquido denso (densità 1,26 g/mL) di colore marrone e caratteristica profumazione dolce.

OLIO ESSENZIALE DI MANDARINO – La Saponaria

Denominazione INCI: CITRUS NOBILIS PEEL OIL

Caratteristiche chimico-fisiche: estratto di mandarino ottenuto per spremitura a freddo della buccia. Si tratta di un liquido di colore arancione e caratteristica profumazione dolce e fruttata.

OLIO ESSENZIALE DI LAVANDA – Università del Piemonte Orientale

Denominazione INCI: LAVANDULA ANGUSTIFOLIA OIL

Liquido incolore e con odore caratteristico.

Ottenuto dal Laboratorio di Chimica Inorganica del Dipartimento di Scienze del Farmaco (Università del Piemonte Orientale) per distillazione della lavanda in corrente di vapore e successiva separazione dall'acqua di lavanda.

METODI

1. Estratto di canapa industriale

In questo lavoro di tesi sono stati formulati emulgeli contenenti un estratto di canapa industriale, fornito dal “Laboratorio chimico Extracta Srl”. Tra i diversi fitoestratti forniti dall’Azienda è stato deciso di utilizzare il fitocomplesso AC3.3, denominato di seguito “fitoestratto”, oggetto di un altro lavoro sperimentale svolto presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell’Università del Piemonte Orientale [Grassi L., 2024].

A fine 2023 il “Laboratorio chimico Extracta” ha inoltrato richiesta elettronica al Comitato internazionale per la nomenclatura degli ingredienti cosmetici (INC), tramite il Personal Care Products Council (PCPC), per l’ottenimento della nomenclatura INCI dell'estratto AC3.3. Nella domanda è stato specificato che si trattava di un derivato da infiorescenze della *Cannabis sativa* L. (Pianta Cannabaceae Italia, Europa), purificato e ricco di cannabidiolo (CBD) e acido cannabidiolico (CBDA), di aspetto e consistenza di resina densa di colore giallo-arancio, con odore caratteristico.

Il fitoestratto è caratterizzato da un totale di 93,47% di CBD, suddiviso in 44,27% di CBD, 49,21% di CBDA, 0,45% di cannabigerolo (CBG) e 1,12% di cannabicromene (CBC).

La procedura di estrazione brevettata dall’Azienda prevede più passaggi per i quali, a seconda del solvente utilizzato, si ottengono prodotti diversi dal punto di vista quali-quantitativo. [Cuadari A., 2023]. Il solvente utilizzato per la fase di estrazione del fitoestratto è stato l’acetone che ha permesso di ottenere una resa di prodotto elevata, pari al 70%, maggiore di quella che si ottiene in genere con agli altri solventi (come, per esempio, il metanolo e l’etanolo).

Dopo aver ottenuto l’estratto acetone da *kief* e infiorescenze di *Cannabis sativa* L., chemotipo IV, il prodotto è stato filtrato per rimuovere la parte fibrosa, ottenendo un estratto resinoso noto come *raw extract*.

Per rimuovere cere e acidi grassi indesiderati, il *raw extract* è stato completamente disciolto in metanolo in un maceratore e incubato in freezer per 12 ore al buio. Il prodotto è stato quindi filtrato tramite filtro Büchner per eliminare le cere e gli acidi grassi che durante conservazione in frigo si sono solidificate e separate dal resto del liquido, processo definito di *winterizzazione*.

Le cere e gli acidi grassi, che rappresentano circa il 10% del prodotto sottoposto a estrazione, vengono considerate un prodotto di scarto denominato residuo *winterizzato* “Wint”.

Dopo la *winterizzazione*, i residui di solvente sono stati eliminati tramite evaporatore rotante e l'estratto è stato decolorato per eliminare la clorofilla, prevenendo così la foto-ossidazione del prodotto.

Durante il processo di *winterizzazione*, il fitoestratto è stato opportunamente trattato per ridurre il tenore delle sostanze psicoattive (THC e THCA); le concentrazioni di queste molecole, infatti, devono essere conformi con il Regolamento cosmetico, il cui II Allegato riporta che le materie prime derivate dalla cannabis utilizzate nei cosmetici devono avere un contenuto di THC inferiore a 0,2% [Regolamento (CE) n. 1223/2009].

2. Valutazione dell'attività antiossidante dei derivati della canapa industriale

Tra i derivati della cannabis, il CBD è quello più utilizzato nei prodotti cosmetici per i suoi effetti antiossidanti e antirughe. In particolare, è noto che il CBD migliora le attività degli enzimi antiossidanti, quali la glutatione perossidasi (GSH-Px) e la superossido dismutasi (SOD). Il miglioramento dell'attività degli enzimi antiossidanti comporta a una riduzione del contenuto di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si formano in risposta all'esposizione della pelle a fattori esogeni come raggi ultravioletti, farmaci o a causa di fattori endogeni come ormoni o processi metabolici [Dawidowicz A. L. *et al.*, 2021].

I ROS, se prodotti ad alti livelli, risultano essere pericolosi in quanto possono portare a danno cellulare, decomposizione della matrice extracellulare e dei componenti che in condizioni normali permettono di mantenere la pelle levigata ed elastica come il collagene, l'elastina e la fibronectina [Xuelian C. *et al.*, 2023].

In questo lavoro di tesi l'attività antiossidante di CBD e CBDA di origine sintetica e del fitoestratto è stata valutata mediante il test colorimetrico con il radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH[•]), che consiste nel valutare il decadimento del radicale DPPH[•] tramite una reazione colorimetrica.

La molecola di DPPH[•] presenta un radicale libero e la sua soluzione è caratterizzata da una colorazione viola intenso. Essendo una reazione colorimetrica, la soluzione di DPPH[•] vira dal viola al giallo quando questo radicale estrae un atomo di idrogeno da altre molecole per dare origine alla forma ridotta DPPH-H [Badarinath A.V. *et al.*, 2010].

I campioni da analizzare sono stati preparati con soluzioni metanoliche aventi le seguenti concentrazioni: 12,5, 25, 50, 100 e 500 µg/mL. Inoltre, è stata preparata una soluzione metanolica di DPPH[•] (56 µg/mL).

Per questo esperimento il fitoestratto è stato pesato in un quantitativo tale da ottenere l'1% p/p di CBD+CBDA.

Dopo incubazione per 20 min al buio, l'assorbanza dei campioni è stata letta a 515 nm mediante un lettore di micropiastre [Bari E. *et al.*, 2023].

La formula utilizzata per calcolare la percentuale di attività antiossidante è stata la seguente:

$$\text{attività antiossidante (\%)} = \frac{Act - Ac}{Act} \times 100$$

dove Act è l'assorbanza del “controllo test” e Ac è l'assorbanza corretta del “campione test”.

Per condurre questo esperimento è stata utilizzata una piastra (Figura 9) nei cui pozzetti sono state introdotte le seguenti soluzioni:

- una soluzione denominata “campione test”, costituita da 270 μL di soluzione metanolica di DPPH \cdot e 30 μL delle soluzioni dei campioni alle diverse concentrazioni;
- una soluzione denominata “controllo test”, costituita da 270 μL di DPPH \cdot e 30 μL di acqua;
- una soluzione denominata “bianco test”, costituita da 270 μL di metanolo e 30 μL delle soluzioni dei campioni alle diverse concentrazioni. Il “bianco test” è stato predisposto per discriminare la colorazione data dal viraggio del DPPH \cdot con quella riscontrata nel caso di soluzioni di “campione test” non trasparenti, come le soluzioni di fitoestratto.

Piastra a		Campioni test			Bianco test
	µg/mL	1	2	3	4
CBD	500	A1	A2	A3	A4
CBD	100	B1	B2	B3	B4
CBD	50	C1	C2	C3	C4
CBD	25	D1	D2	D3	D4
CBD	12,5	E1	E2	E3	E4
Controllo test		F1	F2	F3	F4
Piastra b		Campioni test			Bianco test
	mg/mL	5	6	7	8
CBDA	500	A5	A6	A7	A8
CBDA	100	B5	B6	B7	B8
CBDA	50	C5	C6	C7	C8
CBDA	25	D5	D6	D7	D8
CBDA	12,5	E5	E6	E7	E8
Piastra c		Campioni test			Bianco test
	mg/mL	9	10	11	12
Fitoestratto	500	A9	A10	A11	A12
Fitoestratto	100	B9	B10	B11	B12
Fitoestratto	50	C9	C10	C11	C12
Fitoestratto	25	D9	D10	D11	D12
Fitoestratto	12,5	E9	E10	E11	E12

Figura 9: Rappresentazione schematica della piastra utilizzata per valutare l'attività antiossidante di CBD (a), CBDA (b) e fitoestratto (c).

All'interno della piastra (Figura 9, a – b – c), le soluzioni “campioni test” sono state analizzate in triplo per ogni concentrazione. Inoltre, è stato occupato un pozzetto per il “bianco test” per ogni concentrazione delle soluzioni campione e quattro pozzetti per il “controllo test”.

3. Preparazione di emulgeli a base di fitoestratto

Secondo la definizione della Farmacopea Ufficiale Italiana “i geli sono costituiti da liquidi gelificati per mezzo di opportuni gelificanti”; sono quindi preparazioni semisolide composte da sistemi dispersi solido-liquido, in cui la fase disperdente liquida è immobilizzata da un reticolo tridimensionale formato dalla fase dispersa solida [Farmacopea Ufficiale Italiana XII ed.].

In questo lavoro di tesi sono stati preparati degli idrogeli che contengono una fase oleosa strutturata in un reticolo tridimensionale di gel polisaccaridico a base acquosa. Questa tipologia di preparazione, definita emulgel, è caratterizzata da facile applicazione e *texture* piacevole e non untuosa [Bettiol F. *et al.*, 2018]. Un aspetto importante degli emulgeli è che, a differenza di altre preparazioni topiche prevalentemente idrofile, non provocano disidratazione cutanea; per questo motivo sono adatti per l'applicazione su zone di cute secca, condizione spesso associata a patologie come la psoriasi [Picco A. *et al.*, 2023].

In questo lavoro sono stati preparati quattro emulgeli, codificati E1, E2, E3 e E4, che contenevano il fitoestratto e che si differenziavano per la fase oleosa: erano infatti costituiti rispettivamente da olio di semi di canapa (OdC), olio di nocciolo di albicocca (OdA), olio di nocciolo di pesca (OdP) e residuo *winterizzato* (Wint).

Inoltre, sono stati allestiti quattro emulgeli di riferimento, privi dell'estratto e codificati E1ref, E2ref, E3ref e E4ref, contenenti rispettivamente OdC, OdA, OdP e Wint (Tabella 4).

Come emulsionante-gelificante è stata utilizzata una materia prima, il cui nome commerciale è Instathix[®], caratterizzata dalla capacità di fungere anche da stabilizzante e modificatore reologico: è infatti costituita da una miscela ingredienti di origine naturale, la gomma xantana, il sodio stearoil lattilato, l'amido di tapioca e l'alginato di sodio.

Per preparare 100 g di ciascun emulgel è stato seguito il procedimento di seguito descritto.

Su bilancia analitica è stato pesato 1 g di fitoestratto, al quale sono stati successivamente incorporati 2 g di olio. Per la preparazione della fase acquosa, la quantità di acqua distillata necessaria è stata posta in una beuta e scaldata su bagnomaria fino alla temperatura di 70 °C, raggiunta la quale sono stati aggiunti 3 g di Instathix[®] esattamente pesati. A dispersione avvenuta, la fase acquosa è stata addizionata a quella oleosa.

Per quanto riguarda E1, E2, E3, E1ref, E2ref e E3ref le due fasi sono state sottoposte a emulsione e omogeneizzazione tramite Ultra-Turrax[®] a 11000 giri/min, fino a completa dispersione dell'agente emulsionante e visibile aumento di viscosità del sistema.

Lo stesso procedimento è stato seguito anche per E4 e E4ref, a eccezione della fase di emulsione che è stata eseguita a caldo a causa della consistenza semisolida del Wint, la quale rendeva la dispersione di questa materia prima più difficoltosa. Quindi, prima del processo di emulsione, il fitoestratto e il Wint sono stati dispersi in un becher contenente acqua posto su bagnomaria a 40 °C.

Ogni preparazione è stata confezionata in contenitori chiusi ermeticamente e conservata in frigorifero.

Tabella 4: Composizione quali-quantitativa degli emulgeli.

Ingredienti	Composizione degli emulgeli (% p/p)							
	E1	E2	E3	E4	E1ref	E2ref	E3ref	E4ref
Olio di canapa	2,0	---	---	---	2,0	---	---	---
Olio di nocciolo di albicocca	---	2,0	---	---	---	2,0	---	---
Olio di nocciolo di pesca	---	---	2,0	---	---	---	2,0	---
Residuo <i>winterizzato</i>	---	---	---	2,0	---	---	---	2,0
Emulsionante - gelificante	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Fitoestratto	1,0	1,0	1,0	1,0	---	---	---	---
Acqua distillata	qb							

4. Caratterizzazione degli emulgeli

Gli emulgeli preparati sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico e tecnologico. Sono state valutate le caratteristiche organolettiche e il pH di tutti gli emulgeli; per quanto riguarda E1, E2, E3 e E4 è stato valutato anche il comportamento reologico, è stato condotto uno studio di stabilità ed è stato determinato il contenuto percentuale di fitoestratto (titolo).

4.1. Caratterizzazione organolettica

Le caratteristiche organolettiche degli emulgeli, quali aspetto, colore e odore, sono state valutate tramite osservazione diretta, 24 h ($t=24h$) dopo l'allestimento della preparazione.

4.2. Caratterizzazione chimico-fisica

Il pH cutaneo, il cui valore dipende dalle sostanze idrosolubili presenti nello strato corneo, varia a seconda della zona corporea oltre che in base al sesso: mediamente nella donna è pari a 5,5, mentre per l'uomo è circa 5,0 [D'Agostinis G. *et al.*, 2022].

La misurazione del pH permette di verificare la dermo-compatibilità delle preparazioni per applicazione cutanea: il pH deve infatti essere compreso tra 4,5 e 5,5, valori che non si discostano da quelli del pH fisiologico della pelle.

Inoltre, la determinazione del pH viene effettuata anche per verificare la stabilità delle preparazioni nel tempo.

In questo lavoro di tesi il pH degli emulgeli è stato misurato il giorno stesso della preparazione ($t = 0$).

4.3. Studio della viscosità

La reologia è la disciplina che studia le proprietà di flusso e di deformazione della materia [Aulton M.E. *et al.*, 2015].

Lo studio reologico permette di valutare il comportamento del materiale sotto sollecitazione esterna, il quale può andare incontro a deformazione che può essere reversibile o irreversibile: nel primo caso viene definita elasticità, nel secondo flusso.

Per le preparazioni semisolide per uso cutaneo la deformazione non deve essere elastica ma plastica, perché il materiale che si applica deve poter essere spalmato sulla cute e il principio attivo o funzionale veicolato deve poter essere reso disponibile.

In campo cosmetico, come in quello farmaceutico, lo studio reologico delle preparazioni semisolide risulta essere fondamentale:

- per la comprensione delle caratteristiche tecnologiche, che influenzano la miscelazione, la spalmabilità e la stabilità del prodotto finito;
- per le fasi legate al confezionamento e l'erogazione del prodotto contenuto all'interno del *packaging*.

La viscosità è definita come la resistenza di un materiale a fluire; questa proprietà viene influenzata da dimensione e forma delle molecole, composizione chimica e struttura fisica del corpo in esame e temperatura. L'unità di misura della viscosità è il Poise (1 P = 0,1 Pa x s), tuttavia più spesso si usa il cP (1 cP = 1 mPa x s).

Per comprendere il fenomeno di resistenza allo scorrimento si può immaginare un fluido deformabile su un piano fisso, costituito da superfici piane e parallele, a poca distanza l'una dall'altra. Applicando una forza costante, tangente al piano superiore di un fluido si genera un flusso laminare, questo si muoverà con una velocità costante trascinando con sé il piano superiore del fluido che a sua volta trascinerà quello sottostante, e così via. Ognuno di questi piani scorrerà con una velocità sempre inferiore rispetto a quello sovrastante, fino ad arrivare all'ultimo piano che rimarrà fermo (Figura 10).

La forza applicata per unità di superficie (F/A) è uguale alla costante di viscosità (η) per il gradiente di velocità (dv/dy):

$$F/A = \eta \times dv/dy$$

- F/A è lo sforzo di taglio SS (*shear stress*) espresso in N/m^2 (Pa);
- dv/dy è il gradiente di velocità di scorrimento SR (*shear rate*), espresso in 1/s;
- η è la viscosità, uguale a SS/SR, è espressa in Pa/s (1 Pa/s = 10 P).

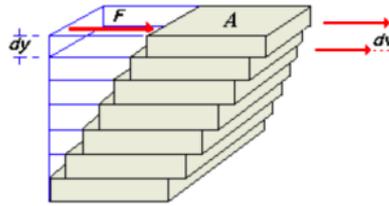


Figura 10: Rappresentazione schematica del gradiente di velocità di scorrimento [Colombo P. et al., 2015].

Lo studio della viscosità degli emulgeli E1, E2, E3 e E4 è stato condotto utilizzando il viscosimetro rotazionale tipo Brookfield, a 33 °C, con la girante numero 25, dopo 24 ore dall'allestimento della preparazione.

Un'aliquota di ciascun emulgel è stata inserita in una *small cup* termostata, all'interno della quale la girante selezionata, collegata tramite un albero al motore del viscosimetro, è stata fatta ruotare da 0,05 rpm a 60 rpm (curva di andata) e da 60 rpm a 0,5 rpm (curva di ritorno). La girante che ruota all'interno del campione incontra una resistenza che dipende dalla viscosità del fluido analizzato: maggiore è la resistenza incontrata, maggiore è la viscosità del fluido. Questa resistenza viene misurata dal viscosimetro come "deviazione della girante rispetto all'asse perpendicolare alla girante", ovvero come percentuale di torsione che verrà tradotta dal viscosimetro in viscosità.

Il viscosimetro di Brookfield fornisce anche i valori di SR e SS, che sono stati utilizzati per costruire il diagramma di flusso, mentre viscosità (in cP) e velocità (in rpm) sono stati impiegati per costruire il diagramma di viscosità.

5. Essiccamento degli emulgeli per *spray-drying*

Lo *spray-drying* è una tecnica che permette di convertire una soluzione, un'emulsione o una sospensione in polvere attraverso il processo di atomizzazione [Picco A., *et al.*, 2023]. Questa tecnica, ampiamente utilizzata in ambito farmaceutico, cosmetico e alimentare, presenta molti vantaggi rispetto ad altre tecniche di essiccamento: permette infatti la produzione anche continua di polveri, costituite da particelle di forma sferica e diametro uniforme, e con ridotto contenuto di umidità [Colombo P. *et al.*, 2015]. Lo *spray-drying* è una tecnica utilizzata anche per trattare materiali termosensibili: l'esposizione delle goccioline atomizzate al mezzo essiccante caldo è infatti molto breve (dell'ordine dei millisecondi) e il processo è molto rapido grazie all'elevato rapporto superficie/volume delle goccioline [Jafari S.M. *et al.*, 2022].

La tecnica di *spray-drying* si compone di più fasi: la preparazione del campione da trattare, la nebulizzazione di tale campione in piccole goccioline e il loro essiccamento con aria calda e secca che viene fatta circolare all'interno di una camera di essiccamento; infine, si effettua la separazione nonché la raccolta delle particelle solide prodotte [Sekvamuthukumaran M. *et al.*, 2020].

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato uno *spray-dryer* (Mini Spray-Dryer, B-290, Büchi) dotato di una pompa peristaltica che trasporta il campione da trattare all'ugello di atomizzazione; quest'ultimo è accoppiato a un diffusore (in genere del diametro di 1,4 o 1,5 mm) responsabile della formazione del "cono di atomizzazione", verticale e uniforme, indispensabile per un'uniforme ed efficace essiccamento del campione trattato [Manuale Büchi]. Una volta caricato il prodotto da trattare, le goccioline di liquido contenute nel campione sono state atomizzate attraverso l'ugello, sotto un flusso di aria compressa collegato allo strumento (Figura 11). Le goccioline atomizzate devono poi essere essiccate, quindi passare attraverso la torre, una camera in cui circola aria calda e secca.

**Atomizzatore
a pressione**

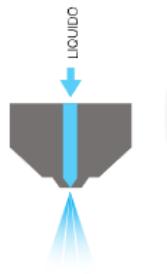


Figura 11: Rappresentazione di un atomizzatore a pressione [APTsol.com].

Nella torre, dopo il processo di atomizzazione del liquido da trattare, si forma la polvere che, in seguito, raggiunge il ciclone separatore che permette all'aria di fuoriuscire dalla parte alta del ciclone e alla polvere di depositarsi nel raccoglitore posto alla base del ciclone.

Lo *spray-dryer* è dotato anche di un filtro (in tessuto poliestere) che impedisce la contaminazione dell'ambiente e permette la raccolta di particelle finissime che non è possibile separare nel ciclone (Figura 12).

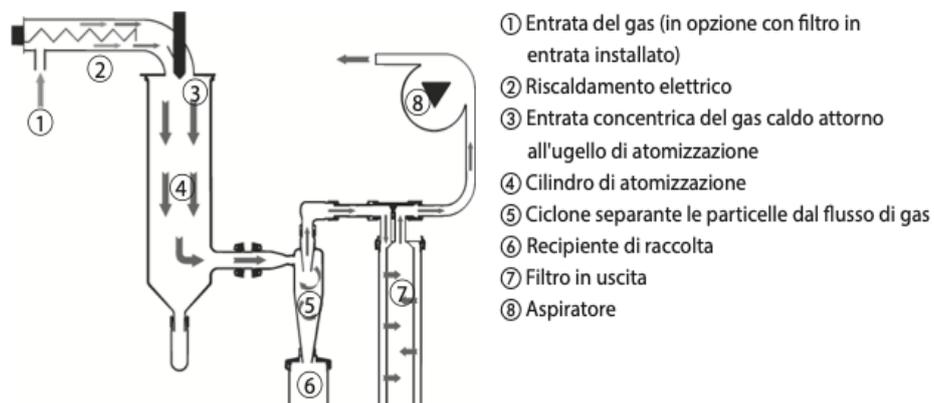


Figura 12: Schema del principio di funzionamento di spray-drying [Büchi.com].

Tutti gli emulgeli preparati in questo lavoro sono stati trattati mediante lo *spray-dryer* riportato in Figura 13.



Figura 13: Spray-dryer B-290 [Büchi.com].

I parametri del processo di essiccamento a spruzzo sono stati impostati sulla base di un lavoro precedente relativo a emulgeli contenenti CBG, un cannabinoide non psicoattivo simile al CBD [Picco A. *et al.*, 2023]: diametro dell'ugello 0,7 mm; pressione di atomizzazione 2,5 bar; portata materiale atomizzato 12 g/min; temperatura dell'aria in ingresso (T_{inlet}) 130 °C; temperatura dell'aria in uscita (T_{outlet}) 56 °C; aspiratore 100%. Di tutti questi parametri, quello più importante per la modulazione di alcune caratteristiche tecnologiche delle particelle essiccate, come la forma, le dimensioni e l'umidità residua, è la T_{outlet} [Ameri M. *et al.*, 2007].

Per ridurre il contenuto di umidità dell'aria impiegata per essiccare è stato utilizzato un deumidificatore.

Sono stati sottoposti a essiccamento a spruzzo 60 g di ogni emulgel e il risultato di questo processo è stato l'ottenimento di polveri, denominate rispettivamente SDE1ref, SDE2ref, SDE3ref, SDE4ref, SDE1, SDE2, SDE3 e SDE4 (Tabella 5).

Tutte le polveri sono state conservate in frigorifero in *vials* sigillati fino all'analisi per la determinazione del titolo del fitoestratto e all'analisi TGA per la valutazione del contenuto di umidità residua.

Tabella 5: Composizione percentuale degli emulgeli senza fitoestratto ($E1_{ref} \div E4_{ref}$), con fitoestratto ($E1 \div E4$) e composizione teorica delle corrispondenti polveri ($SDE1 \div SDE4_{ref}$).

Formulazione	Composizione degli emulgeli (% p/p)							
	E1 ref	E2 ref	E3 ref	E4 ref	E1	E2	E3	E4
Fase oleosa	OdC	OdA	OdP	Wint	OdC	OdA	OdP	Wint
	2				2			
Emulsionante	3				3			
Fitoestratto	---				1*			
Acqua	qb				qb			
	Composizione teorica delle polveri (% p/p)							
Polvere	SDE1 ref	SDE2 ref	SDE3 ref	SDE4 ref	SDE1	SDE2	SDE3	SDE4
Fase oleosa	33,3				33,3			
Emulsionante	50,0				50,0			
Fitoestratto	---				16,7			

Delle polveri ottenute dal processo di essiccamento degli emulgeli è stata calcolata la resa percentuale di processo secondo la seguente equazione:

$$Resa (\%) = \frac{\text{polvere recuperata (g)}}{\text{solidi presenti nella formulazione (g)}} \times 100$$

6. Caratterizzazione delle polveri

Le polveri sono state caratterizzate dal punto di vista organolettico valutando colore, odore e aspetto. Invece dal punto di vista tecnologico sono state condotte l'analisi termogravimetrica, per determinare l'umidità residua, e la valutazione della scorrevolezza di SDE1ref e SDE1 tramite misurazione dell'angolo di riposo dinamico. Inoltre, per le polveri SDE1, SDE2, SDE3 e SDE4 è stato condotto uno studio di stabilità ed è stato determinato il titolo in fitoestratto.

6.1. Caratterizzazione organolettica

Le caratteristiche organolettiche delle polveri, quali aspetto, colore e odore, sono state valutate tramite osservazione diretta, immediatamente dopo lo *spray-drying* ($t=0$).

6.2. Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica in cui la variazione della massa di un campione viene registrata in funzione della temperatura, secondo un programma di temperatura controllata [Farmacopea Europea XI ed.,11.5].

La TGA permette di determinare il contenuto di componenti volatili di un materiale (acqua, solventi organici, ecc.) e di studiarne il comportamento di decomposizione in funzione della temperatura [Utschick H., 1999]. Quest'analisi viene effettuata inoltre per valutare la stabilità termica di un prodotto, fattore rilevante per varie proprietà dei materiali quali purezza, e modalità di conservazione [NETZSCH, 2024]. Dalla TGA si ottengono dei profili, o curve termogravimetriche, da cui si può dedurre a quale temperatura il materiale di interesse inizia a degradare (*Tonset*) e di conseguenza fino a quale temperatura è stabile, ovvero non mostra perdita di solventi o fenomeni di degradazione.

L'analizzatore termogravimetrico utilizzato in questo lavoro (TGA 4000, Perkin Elmer) è costituito da una fornace in ceramica al cui interno è presente un'elettro-bilancia, un dispositivo per riscaldare il campione da analizzare, in atmosfera inerte controllata (azoto). Il materiale da caratterizzare è stato posto in un crogiolo di ceramica presente all'interno della fornace [<https://www.perkinelmer.com/>].

L'analisi TGA è stata condotta per determinare la quantità di acqua residua delle polveri SDE1ref, SDE2ref, SDE3ref, SDE4ref, SDE1, SDE2, SDE3 e SDE4, ottenute per essiccamento degli emulgeli E1ref, E2ref, E3ref, E4ref, E1, E2, E3 e E4. I risultati hanno quindi permesso di valutare l'efficienza del processo di essiccamento.

Sono stati inoltre analizzati tutti gli ingredienti utilizzati per la preparazione degli emulgeli, ovvero fitoestratto, OdC, OdA, OdP, Wint ed emulsionante-gelificante (Instathix®).

Per ogni campione da analizzare sono stati caricati nel crogiolo circa 20 mg. L'analisi è stata condotta sotto flusso di azoto (20 mL/min) alla velocità di scansione di 10 °C/min, nell'intervallo di temperatura tra 30 °C e 500 °C per i componenti singoli, mentre per le polveri fino a 600 °C.

6.3. Proprietà di flusso

Uno dei metodi per caratterizzare le polveri è la valutazione della proprietà di flusso. In Farmacopea Europea vengono descritti diversi metodi per valutare la scorrevolezza delle polveri. Quello utilizzato in questo lavoro di tesi è stato l'angolo di riposo dinamico, determinato utilizzando un tamburo rotante (diametro interno 2,5 cm e profondità 1,4 cm) (Figura 14) [Cheng N. *et al.*, 2017].

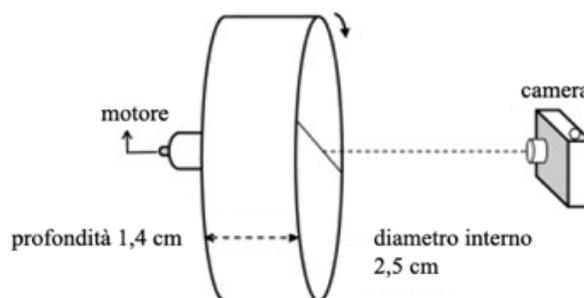


Figura 14: Rappresentazione grafica della determinazione dell'angolo di riposo dinamico [Cheng N. *et al.*, 2017].

L'angolo di riposo dinamico è stato calcolato per SDE1 e per SDE1ref al $t=0$ e dopo 6 mesi ($t=6m$) dal processo di essiccamento mediante *spray-drying*.

Tutte le analisi sono state condotte con 100 mg di polvere poste all'interno di un contenitore sigillato e successivamente inserito nello strumento. Per registrare il movimento delle polveri nel tamburo, è stata utilizzata la fotocamera Panasonic Lumix DMC-FZ300 (1080p HD, 240 fotogrammi al secondo), posizionata orizzontalmente sull'asse centrale del tamburo rotante e la frequenza di rotazione dell'agitatore ad asta (IKA® RW 16) è stata impostata su 3 Hz (180 giri/min) [Picco A. *et al.*, 2023].

Gli angoli tra le linee di base e le linee tracciate sulla pendenza di ciascuna polvere sono stati calcolati utilizzando il software ImageJ (versione 1.53k) e le polveri sono state classificate secondo i parametri riportati nella Farmacopea Europea (Tabella 6) [Farmacopea Europea XII ed., 11.5].

Tabella 6: Valutazione della proprietà di flusso delle polveri [Farmacopea Europea XI ed., 11.5, modificata].

Proprietà di flusso	Angolo di riposo
Eccellente	25-30
Buona	31-35
Discreta	36-40
Passabile	41-45
Scarsa	46-55
Molto scarsa	56-65
Molto, molto scarsa	>66

I risultati di SDE1ref e SDE1 sono stati riportati come valore medio e deviazione standard di 5 determinazioni.

7. Determinazione del contenuto di CBD e CBDA di emulgeli e polveri

Il titolo dei cannabinoidi degli emulgeli E1, E2, E3 e delle rispettive polveri SDE1, SDE2 e SDE3 è stato determinato in collaborazione con il Laboratorio di Chimica degli Alimenti del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università del Piemonte Orientale.

A questo scopo è stato utilizzato uno spettrometro di massa Q-Exactive Plus UHMR Hybrid Quadrupole Orbitrap™ dotato di un sistema UHPLC Vanquish™ Duo (Waltham, MA, USA) e una sorgente elettrospray (ESI) che operavano sia in modalità positiva che negativa, secondo un metodo recentemente messo a punto da un gruppo di ricerca dell'Università di Praga [Maly M. *et al.*, 2023].

8. Ricostituzione e caratterizzazione dell'emulgel E1

La ricostituzione della polvere SDE1 con l'opportuna quantità di acqua ha permesso di ottenere estemporaneamente un emulgel, codificato E1r. In particolare, 1,2 g di SDE1 sono stati dispersi in acqua distillata (q.b. 20 g) e la miscela è stata omogenizzata con una spatola per 1 min. L'emulgel E1r è stato caratterizzato dal punto di vista chimico-fisico: sono state valutate le caratteristiche organolettiche, tra cui aspetto, colore, e odore 24 ore dopo l'allestimento della preparazione; inoltre è stato determinato il pH.

Dal punto di vista tecnologico, invece, è stata determinata la viscosità a $t=24h$.

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di E1, ovvero l'emulgel dal quale la polvere SDE1 è stata ottenuta mediante il processo di *spray-drying*.

9. Test di stabilità di emulgeli e polveri

La stabilità di un prodotto cosmetico è una proprietà estensiva della qualità intrinseca del prodotto stesso, che garantisce che in fase di sviluppo vengano soddisfatti gli standard di qualità chimico-fisici e microbiologici precedentemente stabiliti e che l'aspetto e la funzionalità del prodotto si mantengano in condizioni adeguate di conservazione [Aracri R. *et al.*, 2023].

In particolare, come definito dal Regolamento cosmetico, la Parte A della relazione sulla sicurezza del prodotto cosmetico (PIF: *Product Information File*) deve contenere informazioni sulle caratteristiche fisico-chimiche e sulla stabilità di un prodotto cosmetico. La parte B richiede di considerare gli impatti della stabilità sulla sicurezza del prodotto cosmetico [Kirkbride L. *et al.*, 2021]. Inoltre, nel Regolamento (CE) 1223/2009, precisamente nell'Allegato I vengono riportate le indicazioni su come redigere la Valutazione della Sicurezza, la quale dovrà essere verificata prima della messa in commercio di un prodotto cosmetico [Regolamento (CE) 1223/2009].

Gli studi di stabilità sono fondamentali per l'industria cosmetica, e i loro principali obiettivi sono molteplici tra cui: sviluppo e perfezionamento delle formulazioni, definizione del processo di produzione, come ad esempio informazioni su tempi e temperature di riscaldamento e raffreddamento, omogeneizzazione, confezionamento, e condizioni di conservazione, trasporto e commercializzazione [Aracri R. *et al.*, 2023].

La conservazione di un prodotto cosmetico viene definita dall'articolo 19 del Regolamento cosmetico come “l'intervallo di tempo in cui il prodotto cosmetico, se opportunamente conservato, continua a soddisfare la sua funzione iniziale e non causa danni alla salute umana se utilizzato nelle ragionevoli e prevedibili condizioni d'uso” [Regolamento (CE) 1223/2009].

La durata di conservazione deve essere indicata in etichetta come:

- data di scadenza: la conservazione minima, anche se il prodotto non è stato non aperto, è inferiore a trenta mesi e viene indicata con "usare preferibilmente entro" oppure si utilizza il simbolo della clessidra;
- PAO (*Periodo After Opening*): periodo in cui il prodotto, una volta aperto, è sicuro; il PAO viene indicato per prodotti cosmetici con durata superiore ai trenta mesi [Aracri R. *et al.*, 2023].

In questo lavoro, lo studio di stabilità degli emulgeli è stato condotto seguendo le linee guida ICH Q1A(R2) *Stability Testing of New Drug Substances and Products* sviluppate per l'ambito farmaceutico: non sono infatti disponibili linee guida relative ai prodotti cosmetici. Le considerazioni in merito alla stabilità di un prodotto cosmetico possono infatti essere equiparate a quelle di un medicinale. Queste linee guida riportano le condizioni a cui devono essere sottoposti i campioni in analisi e sono state predisposte sulla base della zona climatica in cui viene previsto il possibile commercio del prodotto [Kirkbride L. *et al.*, 2021].

Aliquote degli emulgeli E1, E2, E3 e E4 sono state poste in contenitori ermeticamente sigillati e conservate secondo le condizioni di seguito riportate:

- a 25 °C, alla luce e al buio;
- a 4 °C ($\pm 0,5$ °C);
- a 40 °C (± 1 °C) e 75% RH (umidità relativa).

Inoltre, è stata valutata anche la stabilità delle polveri ottenute per *spray-drying*, SDE1, SDE2, SDE3 e SDE4, poste in un contenitore sigillato e conservate in frigorifero a $4 \pm 0,5$ °C.

Per lo studio di stabilità, gli emulgeli sono stati analizzati dal punto di vista organolettico al tempo 24 ore ($t= 24h$) in modo da poter confrontare le loro caratteristiche in tempi successivi ovvero, al tempo 1 mese ($t= 1m$), 3 mesi ($t= 3m$) e 6 mesi ($t= 6m$); inoltre degli emulgeli a $t= 3m$ è stata effettuata anche la determinazione del pH; mentre per le polveri, le caratteristiche organolettiche sono state registrate solo a $t= 0$ e $t= 6m$.

I parametri presi in considerazione sono stati:

- aspetto del prodotto;
- odore;
- il colore della formulazione, sulla superficie del prodotto e in prossimità delle pareti del contenitore, utilizzando il metodo dell'osservazione visiva.

10. *Panel test*

Il *panel test* è un'analisi delle caratteristiche sensoriali del prodotto. In questo lavoro di tesi tale test è stato condotto in modo anonimo e secondo un protocollo prestabilito.

Degli emulgeli a base di fitoestratto, è stato selezionato l'emulgel E1 in quanto è risultata essere la preparazione caratterizzata da odore di canapa più persistente e quindi più difficile da mascherare, a causa della presenza dell'olio di semi di canapa nel quale è stato disperso il fitoestratto.

Sono state condotte due analisi sensoriali su 23 volontari, in tempi diversi e con profumazioni differenti, denominate rispettivamente PT1 e PT2. Nel caso di PT1 sono state utilizzate fragranze tra cui oli essenziali, mentre in PT2 sono stati utilizzati composti puri per capire in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche quali potessero essere i componenti in grado di influenzare l'odore della preparazione.

Le fragranze utilizzate in PT1 sono state:

- aroma alimentare naturale fragola bio,
- estratto aromatico naturale di vaniglia bio,
- olio essenziale di mandarino,
- olio essenziale di lavanda.

Quelle utilizzate in PT2 sono state:

- limonene, nome INCI: D-LIMONENE,
- geraniolo, nome INCI: GERANIOL,
- fenil-etil-alcool, nome INCI: PHENETHYL ALCOHOL,
- fucaliptolo, nome INCI: EUCALYPTUS GLOBULUS LEAF OIL,
- beta-pinene, nome INCI: BETA-PINENE.

Sia per l'analisi PT1 che per PT2, sono state aggiunte di ogni fragranza 3 gtt in aliquote da 15 g di emulgel E1.

In seguito, il prodotto è stato omogenizzato in miscelatore centrifugo planetario (modello ARE-250, Thinky Corporation) a velocità a 10000 rpm e in seguito sottoposto a *defoaming* (1 min a 1000 rpm).

I 23 volontari arruolati per le valutazioni sensoriali hanno espresso la propria valutazione dopo l'applicazione sull'avambraccio interno degli emulgeli addizionati delle diverse fragranze.

A ciascun volontario è stato chiesto di valutare:

- l'odore dell'emulgel;
- se e dove lo applicherebbe, a scelta tra viso, mani e corpo;
- la *texture* del prodotto.

Per quanto riguarda l'*odor masking* le risposte a scelta multipla sono state: molto gradevole, gradevole, leggermente gradevole, leggermente sgradevole, sgradevole e molto sgradevole e i rispettivi punteggi assegnati alle risposte precedenti sono stati: 3, 2, 1, -1, -2, -3. I risultati sono stati espressi come media ponderata delle votazioni.

Nel caso di zona di applicazione e *texture* sono invece state considerate le semplici risposte "positivo" (profumazione e *texture* gradevoli) o "negativo" (profumazione e *texture* sgradevoli).

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Nomenclatura INCI del fitoestratto

Il fitoestratto oggetto di questo lavoro è stato caratterizzato quali-quantitativamente nell'ambito di un lavoro sperimentale condotto nello stesso laboratorio in cui è stata svolta questa tesi. Dai risultati cromatografici è emerso che l'estratto ottenuto dalle infiorescenze di canapa industriale appartenenti al chemiotipo CBDA-predominante è costituito da un "Totale cannabidiolo" (T-CBD) pari a 93,47%, di cui 44,27% di CBD e 49,20% di CBDA. L'estratto conteneva inoltre 0,45% di CBG e 1,12% di CBC (Grassi L., 2024).

Sulla base di questa composizione quali-quantitativa e di altre informazioni chimico-fisiche e tecnologiche, il Personal Care Products Council (PCPC) ha identificato il fitoestratto con il nome INCI "Cannabis Sativa Extract" e ha assegnato all'Azienda richiedente (il Laboratorio chimico Extracta) un ID identificativo specifico. In tal modo, l'Azienda potrà impiegare l'estratto come ingrediente di prodotti cosmetici.

2. Caratterizzazione delle materie prime

2.1. Attività antiossidante di fitoestratto, CBD e CBDA

In questo lavoro di tesi, l'attività antiossidante del fitoestratto e di CBD e CBDA come tali è stata valutata a diverse concentrazioni (12,5, 25, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL).

I risultati ottenuti sono riportati nella Figura 15.

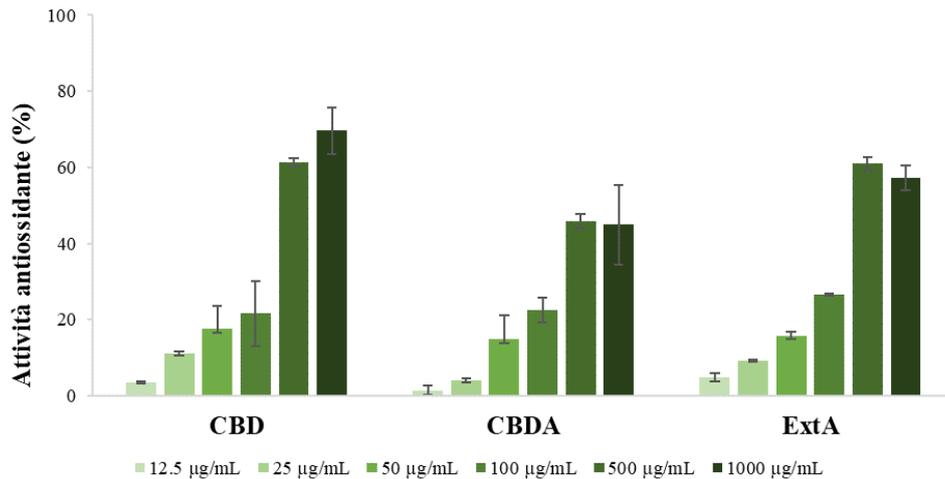


Figura 15: Attività antiossidante di CBD, CBDA e fitoestratto a diverse concentrazioni.

Alla concentrazione più bassa (12,5 µg/mL) è stata registrata un'attività antiossidante di 3,5±0,4%, 1,5±1,3% e 4,9±1,1% rispettivamente per il CBD, il CBDA e il fitoestratto.

A 25 µg/mL l'attività è risultata essere 11,2±0,5% per il CBD, 4,1±0,6% per il CBDA e 9,8±0,3% per il fitoestratto. L'attività del CBD a 50 µg/mL era di 17,5±6,1%, del CBDA di 14,8±6,2% e del fitoestratto di 15,8±0,9%. A 100 µg/mL è stata riscontrata un'attività antiossidante pari a 21,6±8,5%, 22,4±3,3% e 26,5±0,2% rispettivamente per CBD, CBDA e fitoestratto. A 500 µg/mL i valori di attività antiossidante sono stati: 61,2±1,1% per il CBD, 45,9±1,9% per il CBDA e 60,9±1,8% per il fitoestratto. Infine, alla concentrazione più alta, 1000 µg/mL, sono stati ottenuti valori di attività antiossidante di 69,6±6,1%, 44,9±10,5%, 57,9±3,2% per il CBD, il CBDA e il fitoestratto rispettivamente.

Analizzando i risultati è possibile osservare che il CBD presenta un andamento concentrazione-attività antiossidante lineare tra 12,5 µg/mL e 100 µg/mL, mentre da 100 µg/mL a 1000 µg/mL l'aumento in modo molto più accentuato. Per il CBDA e il fitoestratto, invece, è stato osservato *trend* simile fino alla concentrazione di 500 µg/mL; l'attività non è invece variata significativamente alla concentrazione di 1000 µg/mL.

Nella Tabella 7 è stato riportato il confronto dell'attività antiossidante sperimentale del fitoestratto con quella teorica dovuta ai singoli cannabinoidi CBD e CBDA, considerando le percentuali di queste due molecole nell'estratto (44,47% CBD - 49,20% CBDA).

Tabella 7: Attività antiossidante teorica e sperimentale del fitoestratto.

Attività antiossidante (%)	Concentrazioni di CBD, CBDA e fitoestratto (µg/mL)					
	12,5	25	50	100	500	1000
Teorica	2,3	7,0	15,1	20,6	49,7	52,9
Sperimentale	4,9±1,1	9,2±0,3	15,8±0,9	26,5±0,2	60,9±1,8	57,3±3,1

Per tutte le concentrazioni considerate, i risultati sperimentali relativi al fitoestratto sono superiori a quelli teorici, suggerendo l'instaurarsi di un effetto sinergico dei componenti di cui l'estratto è costituito, ovvero cannabinoidi e non-cannabinoidi. In particolare, si presume che la maggiore attività antiossidante sia dovuta alla presenza, tra i componenti non cannabinoidi, di molecole come i polifenoli, la cui azione antiossidante è nota [Izzo L., *et al*, 2020].

2.2. Analisi termogravimetrica

I risultati di analisi termogravimetrica di tutti i componenti degli emulgeli allestiti in questo lavoro, ovvero CBD, CBDA, fitoestratto, emulsionante-gelificante Instathix[®], OdC, OdA e OdP, sono illustrati di seguito.

In particolare, nella Tabella 8 sono riportate le percentuali delle perdite di peso di CBD, CBDA e del fitoestratto in diversi *range* di temperatura, mentre in Figura 16 sono mostrati i profili di degradazione termica da cui tali risultati sono stati ricavati.

Tabella 8: Risultati TGA delle perdite di peso percentuali di CBD, CBDA e fitoestratto.

Campione	Intervallo di temperatura (°C)	Perdita di peso (%)
CBD	30÷500	99,8
CBDA	30÷160	12,9
	160÷500	86,4
Fitoestratto	30÷160	6,7
	160÷500	91,9

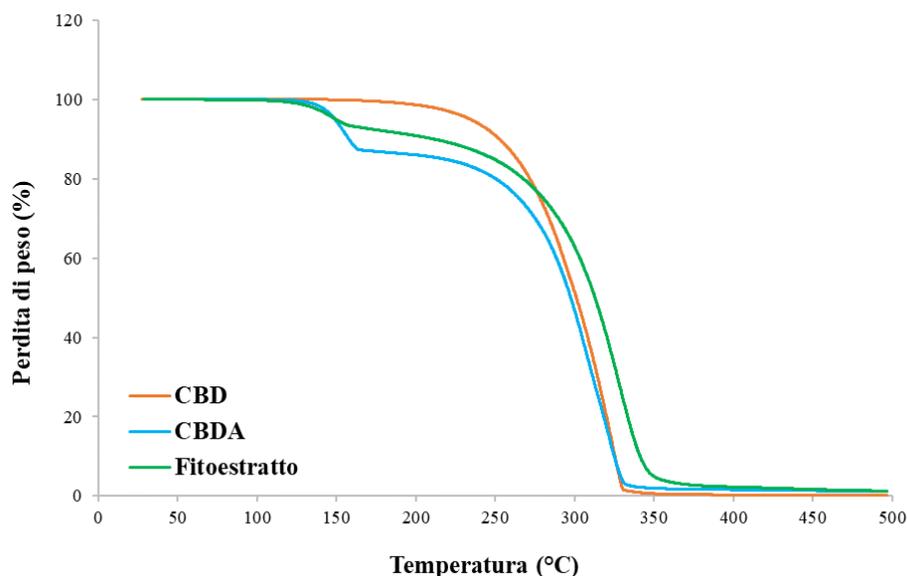


Figura 16: Profili termogravimetrici sovrapposti di CBD, CBDA e fitoestratto.

Il CBD non mostra perdite di peso fino a circa 140 °C (*Tonset*), temperatura alla quale la molecola inizia a degradare fino a decomporsi quasi completamente (99,8%) a temperature superiori a 350 °C.

Per il CBDA è possibile osservare una diminuzione in peso del 12,9% nel *range* di temperatura 30-160 °C (*Tonset* 110 °C), variazione associabile alla perdita della porzione carbonilica della molecola; la perdita di peso che avviene a temperature superiori a 160 °C (pari a 86,4%) presenta un andamento pressoché sovrapponibile a quello del profilo termico del CBD.

Il fenomeno di decarbossilazione nel *range* 30-160 °C è presente anche nel profilo del fitoestratto, caratterizzato da una perdita di peso iniziale di 6,7% e *Tonset* di 100 °C. La degradazione del fitoestratto oltre 160 °C prosegue in modo simile a quanto osservato per il CBD e il CBDA; tuttavia, la curva risulta leggermente traslata verso destra, ovvero verso temperature maggiori: questo *shift* è da attribuire alla composizione complessa del fitoestratto che contiene, oltre a CBD e CBDA, anche numerose altre molecole.

I profili di degradazione dei componenti costitutivi degli emulgeli, Instathix[®], OdC, OdA e OdP sono riportati nelle Figure 17 e 18.

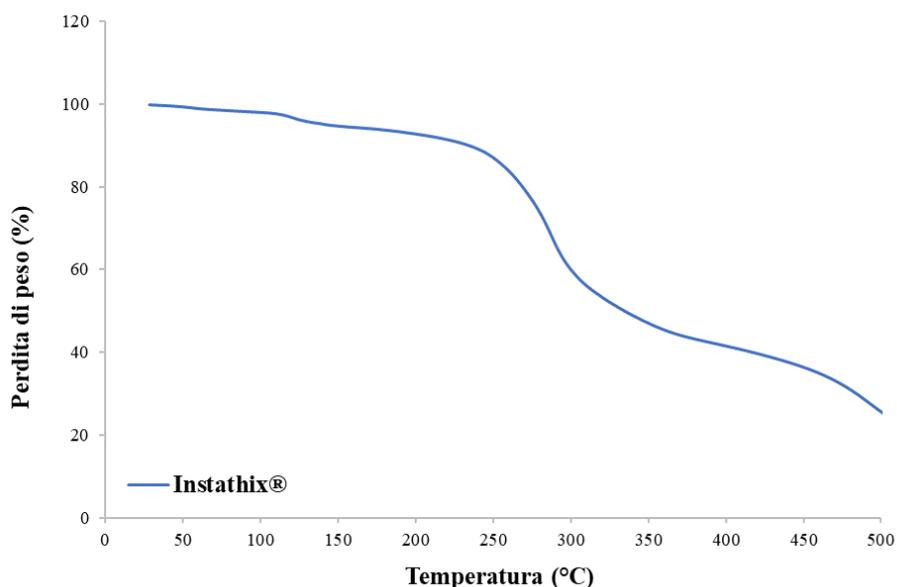


Figura 17: Profilo termogravimetrico dell'emulsionante-gelificante Instathix®.

Dal profilo di degradazione di Instathix® si può osservare che i fenomeni termici principali avvengono a partire da temperature maggiori di 150 °C, fino alla non completa parziale degradazione (78,6%) a 500 °C (Figura 17). Lo *step* iniziale fino a circa 115 °C è invece attribuibile all'evaporazione dell'acqua presente nella materia prima, pari a 1,9%.

Le curve di degradazione di OdC, OdA e OdP sono molto simili tra loro (Figura 18): per tutti i campioni l'inizio dei fenomeni termici si osserva a temperature superiori a 300 °C circa. Le perdite di peso registrate a 500 °C sono comprese tra circa 80,0 e 98,0%.

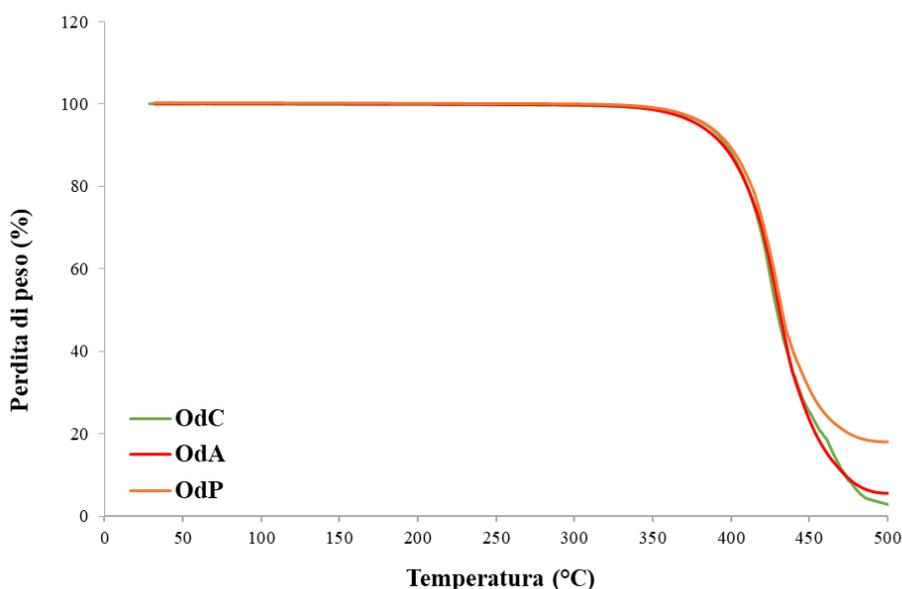


Figura 18: Profilo termogravimetrico degli oli di semi di canapa (OdC), di nocciolo di albicocca (OdA) e di nocciolo di pesca (OdP).

Come atteso, il profilo di degradazione del residuo *winterizzato* (Wint) (Figura 19), ottenuto in fase di estrazione dalla pianta di cannabis, risulta essere significativamente differente rispetto a quello di OdC, OdA e OdP (Figura 18).

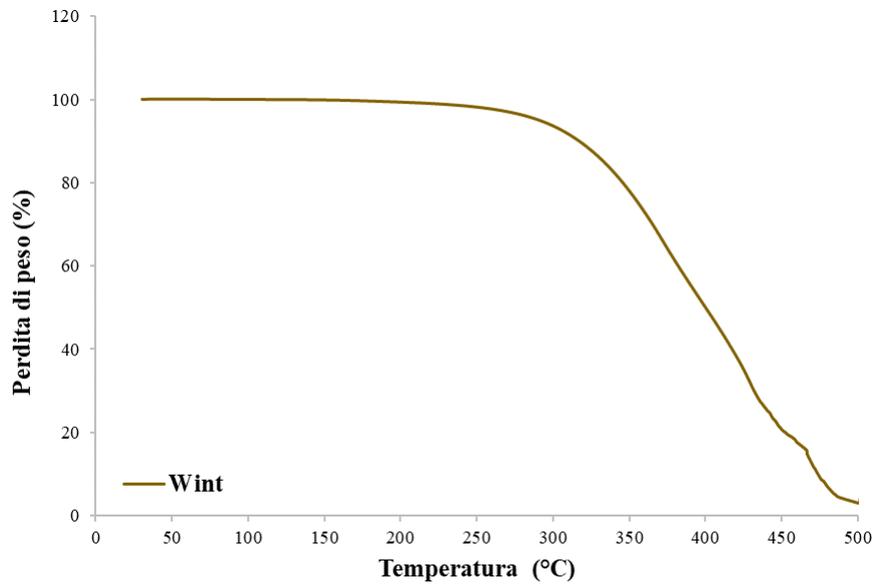


Figura 19: Profilo termogravimetrico del residuo winterizzato (Wint).

3. Caratterizzazione degli emulgeli

In un lavoro di tesi sperimentale svolto in contemporanea con questo è stato studiato il comportamento di permeazione *in-vitro* attraverso membrane bio-mimetiche di CBD e CBDA, come tali e in diversi fitocomplessi. Sulla base dei risultati ottenuti da quegli esperimenti, è stato selezionato il fitoestratto in grado dare origine alla ritenzione nella membrana di quantitativi maggiori di CBD e CBDA, e alla loro permeazione oltre la membrana dei quantitativi minori [Grassi, 2024].

In questo lavoro di tesi, il fitoestratto selezionato è stato utilizzato per la formulazione di emulgeli, la cui fase lipofila era costituita da diversi oli (OdC, OdA, OdP e Wint). Tutti gli emulgeli sono stati caratterizzati dal punto di vista organolettico (aspetto, colore e odore), chimico-fisico e tecnologico (pH, viscosità e titolo) sia non appena preparati, sia durante lo studio di stabilità.

3.1. Caratterizzazione organolettica

I quattro emulgeli contenenti l'1% del fitoestratto, e codificati E1, E2 e E3 e E4, sono rappresentati in Figura 20.

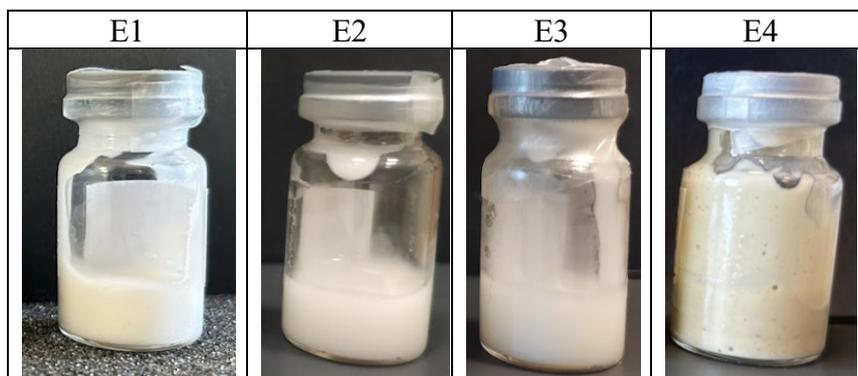


Figura 20: Emulgeli contenenti fitoestratto e OdC (E1), OdA (E2), OdP (E3) e Wint (E4).

Nella Figura 20 è possibile osservare che E1 ha una colorazione giallo pallido, attribuibile alla presenza nell'emulgel dell'OdC, caratterizzato da colorazione gialla. E2 e E3 invece, contenenti OdA e OdP, risultano essere di colore bianco. Il colore beige di E4 è da attribuire al Wint,

residuo del processo estrattivo di colore giallo-marrone intenso. L'aspetto degli emulgeli di riferimento (E1ref, E2ref, E3ref e E4ref - foto non riportata) è risultata essere molto simile a quella dei rispettivi emulgeli (E1, E2, E3 e E4); tuttavia questi ultimi, come atteso, erano contraddistinti da una tonalità leggermente più scura per la presenza del fitoestratto.

Le preparazioni E1, E2, E3 e E4, presentavano un aspetto omogeneo e senza la presenza di aggregati: non si sono riscontrate differenze significative tra gli emulgeli, nemmeno nel caso di E4, più critico in fase di allestimento per via della consistenza semisolida di Wint, più difficoltoso da incorporare rispetto agli oli.

L'odore degli emulgeli con fitoestratto (E1, E2, E3 e E4) era quello caratteristico della canapa, mentre gli emulgeli di riferimento, senza fitoestratto (E1ref, E2ref, E3ref e E4ref), non presentavano odore particolare, ad eccezione di E1ref, formulato con OdC.

3.2. pH

Il pH degli emulgeli è stato misurato appena dopo la preparazione ($t=0$), riportato in Tabella 9, i valori sono compresi tra 5,16 e 5,20 per gli emulgeli contenenti il fitoestratto (E1, E2, E3 e E4) e 4,67 e 5,01 per gli emulgeli di riferimento (E1ref, E2ref, E3ref e E4ref). In tutti i casi i valori riscontrati sono simili a quello del pH fisiologico della pelle (compreso tra 4,5 e 5,5).

Tabella 9: Risultati di pH degli emulgeli.

Emulgel	pH
E1ref	5,01±0,09
E2ref	5,01±0,07
E3ref	5,01±0,10
E4ref	4,67±0,09
E1	5,20±0,05
E2	5,16±0,05
E3	5,16±0,06
E4	5,19±0,27

3.3. Viscosità

Le curve di flusso degli emulgeli E1, E2, E3 e E4, costruite con i valori di viscosità ottenuti a diverse velocità di rotazione, sono riportate nella Figura 21.

Le misurazioni sono state effettuate dopo 24 ore dall'allestimento degli emulgeli per permetterne la stabilizzazione fisica: Instathix[®], ingrediente con funzione emulsionante e gelificante, necessita infatti di alcune ore per idratarsi e dare origine a una struttura gelificata [<https://www.alchemy-ingredients.com/ingredients/instathix>].

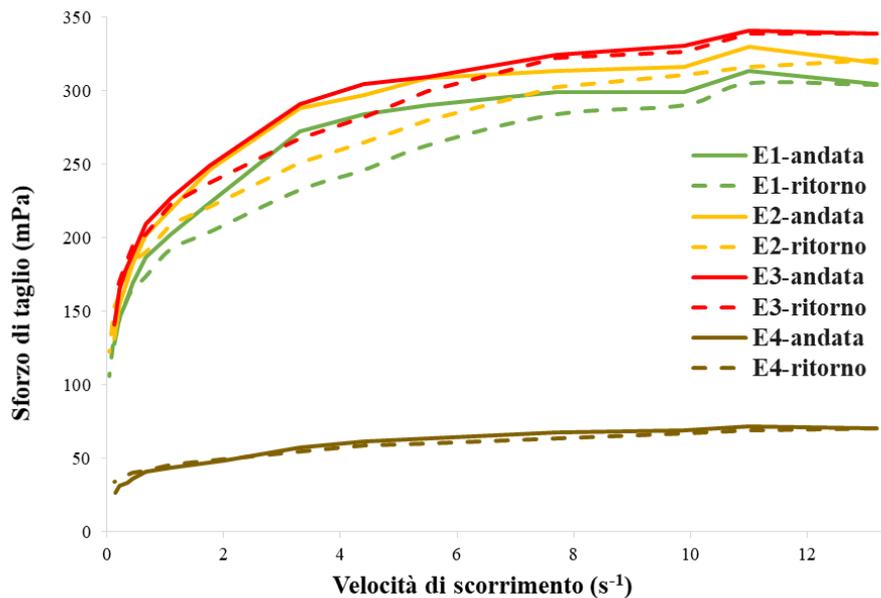


Figura 21: Curve di flusso di andata (linea tratteggiata) e di ritorno (linea intera) di E1 (verde), E2 (giallo), E3 (rosso) e E4 (marrone).

Tutti gli emulgeli mostrano un comportamento di fluidificazione sotto sforzo tipico dei fluidi plastici non-newtoniani: la loro viscosità, data dalla pendenza della curva di flusso, diminuisce gradualmente sotto l'azione di una forza (Aulton M.E. *et al.*, 2015).

Le curve di flusso sono rappresentate da un grafico che non passa per l'origine ma interseca l'asse x in un punto che rappresenta il "limite di scorrimento" o *yield value*. Questa resistenza allo scorrimento è attribuibile alla rete polimerica dell'emulsionante-gelificante che, oltre al tensioattivo stearoil lattilato, contiene gomma di xantana, amido di tapioca e alginato di sodio, che fungono da modificatori reologici.

Inoltre, per E1, E2 e E3, caratterizzati da valori di sforzo di taglio simili, risulta evidente che non c'è completa sovrapposibilità tra le curve di andata e quelle di ritorno, a indicare un comportamento tissotropico di questi emulgeli. La tissotropia è un fenomeno tempo-dipendente e tipico dei fluidi plastici non-newtoniani che consiste nella diminuzione reversibile della viscosità del prodotto sottoposto a uno sforzo di taglio; è il risultato della formazione di legami deboli nella struttura reticolare tridimensionale, che si rompono facilmente quando la dispersione è soggetta a forze di taglio. Quando queste preparazioni vengono applicate, le forze di taglio che si generano portano alla rottura della struttura tridimensionale degli emulgeli, facilitandone la spalmabilità. La tissotropia è presente, anche se in modo meno evidente nel caso di E4, e probabilmente è dovuta alla natura resinosa del Wint.

I valori di viscosità di tutti gli emulgeli a 20 rpm sono stati confrontati tra loro e sono stati rappresentati in Figura 22.

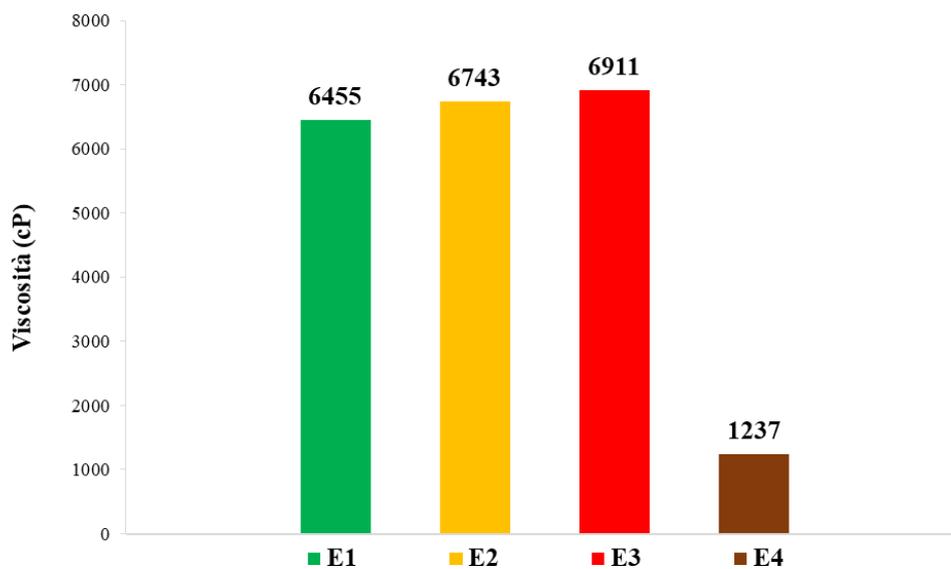


Figura 22: Confronto dei valori di viscosità a 20 rpm degli emulgeli E1, E2, E3 e E4.

Come si evince dalla Figura 22, E1, E2 ed E3 presentano valori di viscosità a 20 rpm non significativamente differenti.

Invece nel caso di E4 la viscosità a 20 rpm (1237 cP) è significativamente inferiore a quella di E1, E2 e E3, risultato associabile alla presenza del Wint, la cui presenza comporta anche una significativa riduzione della viscosità della formulazione che lo contiene.

3.4. Contenuto di CBD e CBDA

Il contenuto di CBD-CBDA, negli emulgeli E1, E2 ed E3, risulta essere sempre superiore all'80%, in particolare pari a 89,06% per E1, 80,62% per E2 e 85,01% per E3.

La determinazione quantitativa del contenuto di CBs di E4 è tuttora in fase di valutazione: è infatti necessario sviluppare un metodo analitico *ad hoc* per la presenza nell'emulgel del residuo di estrazione Wint, la cui composizione quali-quantitativa non è ancora completamente nota, a differenza delle fasi lipofile degli altri emulgeli, ovvero OdC, OdA e OdP.

4. Caratterizzazione delle polveri

I risultati della caratterizzazione delle polveri ottenute tramite *spray-drying* degli emulgeli E1÷E4ref sono di seguito riportati.

4.1. Caratterizzazione organolettica

Le polveri ottenute sono risultate molto fini e volatili. Il colore variava a seconda della presenza o dell'assenza del fitoestratto nella formulazione SDE1ref, SDE2ref e SDE3ref erano infatti caratterizzate da colorazione più chiara rispetto alle polveri ottenute da emulgeli contenenti il fitoestratto (SDE1, SDE2 e SDE3), di colorazione giallina (Figura 23). SDE4 si è differenziata dalle altre polveri a causa della colorazione gialla, data dalla contemporanea presenza del fitoestratto e del Wint; SDE4ref presentava un colore più chiaro, tendente al giallo pallido.

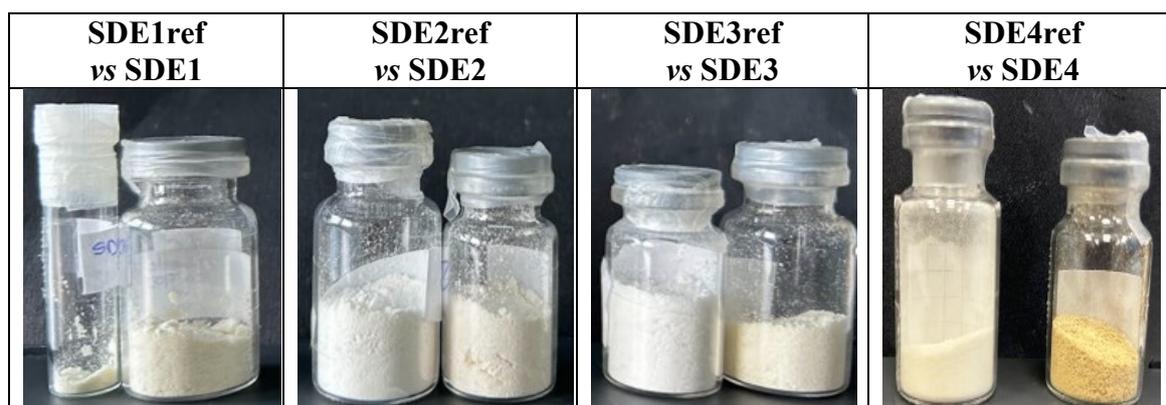


Figura 23: Confronto tra le polveri ottenute per *spray-drying* a partire da emulgeli formulati senza (ref) e con fitoestratto.

4.2. Rese del processo di *spray-drying*

Tutti gli emulgeli sono stati convertiti in polveri (SDE1÷SDE4 e SDE1ref÷SDE4ref) e le rese di processo sono riportate in Tabella 10.

Tabella 10: Rese percentuali del processo di *spray-drying*.

Polveri	Rese (%)
SDE1ref	36,0
SDE2ref	49,1
SDE3ref	39,2
SDE4ref	30,8
SDE1	28,4
SDE2	45,4
SDE3	41,6
SDE4	21,6

Le rese del processo di essiccamento degli emulgeli sono risultate comprese tra 21,0% e 45,0%. Soltanto nel caso di SDE1 e SDE1ref il trattamento di *spray-drying* è stato effettuato in doppio. In particolare, per SDE1ref, SDE2ref, SDE3ref, SDE1, SDE2 e SDE3 la resa di processo era compresa tra 28,4% e 49,1%, valori leggermente superiori rispetto a SDE4ref e SDE4, per i quali le rese sono state del 30,8% e del 21,6%. La presenza del Wint nella formulazione sembrerebbe aver interferito sulla resa di processo: durante il trattamento di essiccamento di E4, infatti, si è osservato il deposito di prodotto sulle pareti della *tower* dello *spray-dryer*, motivo per cui le polveri risultavano visibilmente meno volatili, quindi meno scorrevoli. Inoltre, a parte il caso di SDE3, la presenza del fitoestratto, come atteso, ha comportato la riduzione della resa di processo, per via della minore idrofilia delle preparazioni che lo contengono.

In generale, le rese ottenute sono ritenute soddisfacenti e in linea con i risultati attesi, considerando che è stato impiegato uno *spray-dryer* scala laboratorio e che il processo è stato eseguito trattando quantità di campioni non superiori a 60 g [Ameri M. *et al.*, 2007; Picco A. *et al.*, 2023].

4.3. Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica di tutte le polveri preparate per *spray-drying* ha permesso di valutare l'efficacia del processo di essiccamento degli emulgeli (E1÷E4ref) e di studiare i profili di degradazione delle polveri corrispondenti,

In Figura 24 sono stati riportati i profili termogravimetrici delle polveri SDE1, SDE2, SDE3 e SDE4, preparate a partire dagli emulgeli a base di fitoestratto.

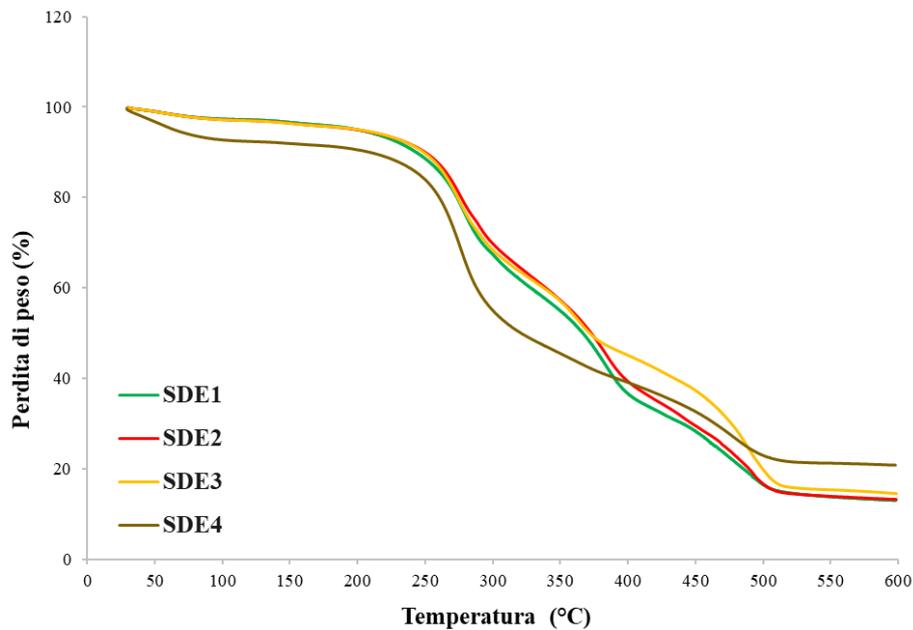


Figura 24: Profili termogravimetrici di SDE (verde), SDE2 (rosso), SDE3 (giallo) e SDE4 (marrone).

Osservando le curve di degradazione delle polveri, è possibile individuare diversi fenomeni termici. Il primo si verifica nel *range* di temperatura compreso tra 30 e 115 °C e rappresenta la perdita di peso attribuibile al contenuto di acqua residua nelle polveri. In particolare, si è registrata una perdita di peso compresa tra 2,6% e 7,2%.

Nel caso di SDE1, SDE2 e SDE3 il processo di essiccamento è risultato più efficiente, in quanto la presenza di fitoestratto comporta una maggiore concentrazione della dispersione trattata (6%) rispetto a quella della dispersione priva di estratto (5%) [Picco A., *et al*, 2023].

Le polveri, ad eccezione di SDE4 (7,2%) e SDE4ref (6,9%), sono quindi risultate caratterizzate da un contenuto di acqua residua piuttosto basso, suggerendo quindi una buona efficacia del processo di *spray-drying*.

Tabella 11: Risultati percentuali del contenuto di acqua residua in tutte le polveri ottenute per *spray-drying*.

Polveri	Umidità residua (%)
SDE1	2,6
SDE2	2,9
SDE3	2,8
SDE4	7,2
SDE1ref	3,1
SDE2ref	5,0
SDE3ref	4,5
SDE4ref	6,9

La perdita di peso osservata nel *range* di temperatura compreso da 115 °C e 170 °C è compresa tra 0,9% e 1,2 per SDE1, SDE2, SDE3 e SDE4. Dal confronto del profilo di degradazione di CBDA e Instathix® (Figure 16 e 17) con quello delle polveri (Figura 24), emerge che questa perdita di peso è riconducibile alla decarbossilazione dei cannabinoidi acidi e a una parziale decomposizione dell'emulsionante-gelificante.

Tra 170 °C a 330 °C è stata registrata una perdita di peso pari a 36,4% per SDE1, 33,7% per SDE2, 34,2% per SDE3 e 43,1% per SDE4, associabile alla degradazione del fitoestratto e a uno degli eventi di decomposizione dell'Instathix®.

Nello *step* tra 330 °C a 435 °C si è verificata una perdita di peso pari a 28,9%, 29,6% e 21,6% per SDE1, SDE2, SDE3 rispettivamente, riconducibile alla degradazione di OdC, OdA, OdP (Figura 18); nello stesso *range* di temperatura considerato, si osserva per SDE4 una perdita di peso maggiore, dovuta al comportamento termico di Wint (Figura 19).

Infine, tra 435 °C a 600 °C è stata registrata una perdita di peso pari a 17,7% per SDE1, 19,3% per SDE2, 25,4% per SDE3 e 14,1% per SDE4, associabile alla degradazione di OdC, OdA e OdP, in maggior misura, a eventi di decomposizione di Instathix®.

4.4. Scorrevolezza

Le proprietà di flusso delle polveri ottenute per *spray-drying* degli emulgeli sono state analizzate con il metodo dell'angolo di riposo dinamico.

È stato possibile valutare la scorrevolezza di SDE1ref e SDE1 a $t=0$, mentre a $t=6m$ non è stato possibile misurare l'angolo di riposo dinamico perché le polveri hanno mostrato una tendenza ad attaccarsi alle pareti del tamburo.

L'angolo di riposo di SDE1ref e SDE1 è risultato pari a $58,0\pm 3,5^\circ$ e $48,0\pm 4,5^\circ$ rispettivamente. Sulla base della griglia di valutazione della Farmacopea Europea riportata nella sezione Metodi, paragrafo 6.3, è possibile affermare che le proprietà di flusso di SDE1 al $t=0$ sono "accettabili", mentre quelle di SDE1ref vengono classificate come "molto scarse". Questi risultati suggeriscono che la presenza di fitoestratto influenza le proprietà di flusso della polvere, migliorando leggermente la scorrevolezza.

Poiché la scorrevolezza è una proprietà fondamentale delle polveri, è necessario migliorare questa caratteristica ottimizzando la formulazione mediante l'aggiunta di ingredienti tecnologici, quali per esempio eccipienti glidanti [Colombo P. *et al.*, 2015].

4.5. Contenuto di CBD e CBDA

Il contenuto di CBD-CBDA nelle polveri SDE1, SDE2 e SDE3 è risultato compreso tra 10,9% e 11,0%. Considerato che il contenuto teorico di fitoestratto delle polveri è del 16,7%, di cui il 13,9% di CBD-CBDA (la rimanente parte rappresenta la frazione non cannabinoide), emerge che i risultati sono soddisfacenti, in quanto è stato ritrovato circa l'80,0% dei cannabinoidi presenti prima del trattamento.

È possibile quindi affermare che il processo di *spray-drying* non ha influito significativamente sul titolo in cannabinoidi delle polveri.

5. Ricostituzione della polvere SDE1

Dall'emulgel E1 è stata ottenuta la polvere SDE1 tramite *spray-drying* e dalla ricostituzione con acqua di quest'ultima è stato preparato l'emulgel estemporaneo E1r.



Figura 30: Da sinistra a destra, emulgel E1 (a sinistra), polvere SDE1 (in centro) ed emulgel ricostituito E1r (a destra).

Confrontando E1 e E1r, riportati in Figura 30, è possibile notare che entrambi gli emulgeli sono caratterizzati da colore bianco, assenza di grumi e omogeneità. Per entrambi inoltre era possibile percepire l'odore caratteristico della canapa.

Dell'emulgel estemporaneo E1r, oltre che le caratteristiche organolettiche, sono stati valutati anche il pH e la viscosità. Il pH dell'emulgel E1r 24 ore dopo l'allestimento ($t=24h$) è risultato di $5,63 \pm 0,66$, simile al pH fisiologico della pelle.

Le curve di flusso di E1r sono state riportate in Figura 31, insieme alle curve di E1.

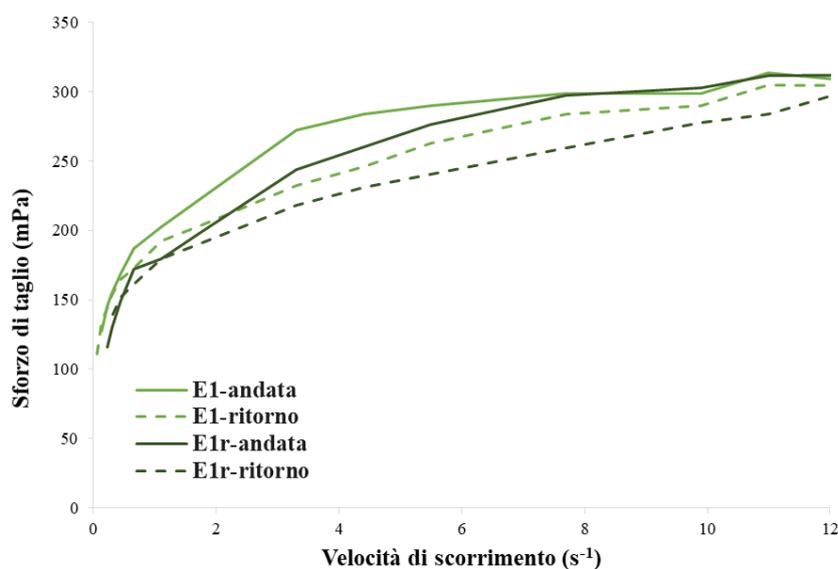


Figura 31: Curve di flusso di andata (linea continua) e ritorno (linea tratteggiata) di E1 (verde chiaro) e E1r (verde scuro).

Dalle curve di flusso è evidente anche per E1r, come per E1, un andamento tipico dei fluidi plastici non-newtoniani, con fluidificazione sotto sforzo e la presenza di caratteristiche tissotropiche.

Sono stati confrontati inoltre i valori di viscosità ottenuti a 20 rpm delle curve di andata e ritorno e si registrano valori molto simili tra loro, compresi in un *range* da 5231 cP a 6455 cP, a indicare che il trattamento di *spray-drying* non ha comportato variazioni significative a carico della struttura dell'emulgel.

6. Stabilità di emulgeli e polveri

6.1. Emulgeli

Di seguito vengono riportati i risultati dello studio di stabilità condotto su aliquote degli emulgeli E1, E2, E3 e E4 conservate per 6 mesi in diverse condizioni di temperatura e luce.

Per gli emulgeli E1, E2 e E4 sono state riportate le foto scattate 24 ore dopo la preparazione della formulazione ($t=24h$) e dopo un mese di stabilità ($t=1m$) (Figure 25, 26 e 27). Le foto a tre e sei mesi di stabilità non sono state riportate in quanto dopo 1 mese di conservazione si è osservata la formazione di muffa. Questo comportamento non si è verificato invece per E3, per il quale sono state riportate le immagini a tempi $t=24h$, $t=1m$, $t=3m$ e $t=6m$ (Figura 28).

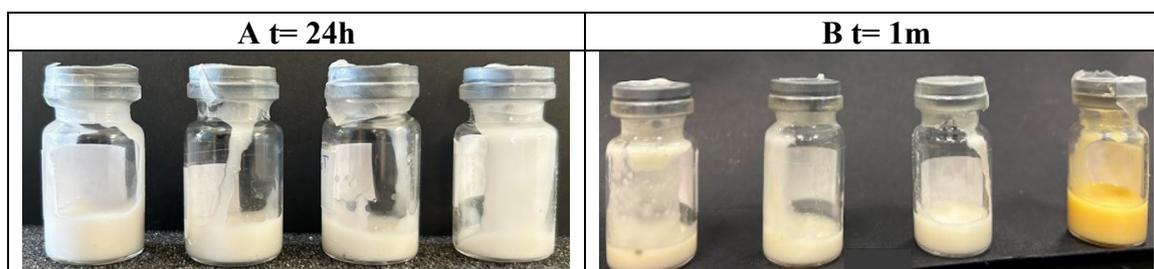


Figura 25: Foto di E1 a 25 °C alla luce (primo vial), a 25 °C al buio (secondo vial), a 4 °C (terzo vial) e 40 °C e 75% RH (quarto vial), ai tempi $t=24h$ (A) e $t=1m$ (B).

Dal confronto di E1 a $t=24h$ con E1 conservato a 25 °C alla luce per un mese (Figura 25B, primo vial) è possibile notare la presenza di muffa. E1 conservato a 40 °C per un mese (Figura 25B, quarto vial) ha invece sviluppato un cambiamento del colore da bianco (Figura 25A, quarto vial) a giallo-arancione (Figura 25B, quarto vial).

Per quanto riguarda l'emulgel E2 al $t=1m$ a 25 °C sia alla luce che al buio si è sviluppata muffa visibile (Figura 26B, primo e secondo vial). E2 conservato a 40 °C per un mese (Figura 26B, quarto vial) ha invece sviluppato un cambiamento di colore da bianco (Figura 26A, quarto vial) a giallo-arancione (Figura 26B, quarto vial).

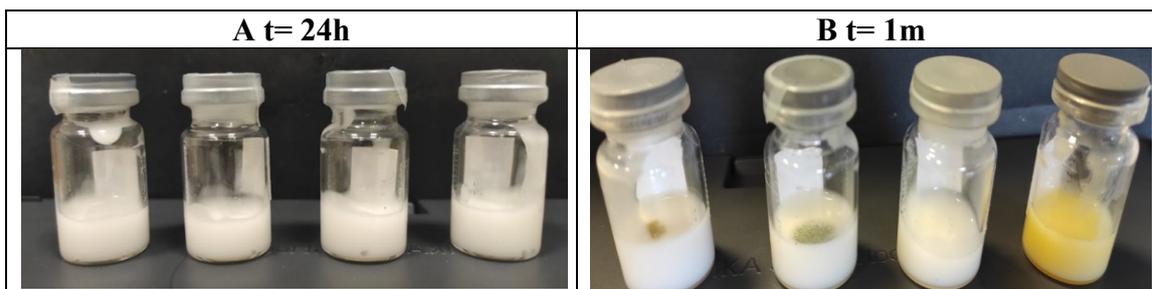


Figura 26: Foto di E2 a 25 °C alla luce (primo vial), a 25 °C al buio (secondo vial), a 4 °C (terzo vial) e 40 °C e 75% RH (quarto vial), ai tempi $t= 24h$ (A) e $t= 1m$ (B).

Per l'emulgel E3, rappresentato in Figura 27, è possibile osservare la presenza di muffa dopo 6 mesi dell'inizio dello studio di stabilità a 40 °C (Figura 27D, quarto vial). Si può notare un cambiamento del colore al $t= 1m$ (Figura 27B) rispetto a $t= 24h$ (Figura 27A), in modo particolare per quanto riguarda l'emulgel conservato a 25 °C alla luce e 40 °C la cui colorazione passa da bianco (Figura 27A, primo e quarto vial) a giallo (Figura 27B, primo e quarto vial) e arancione nei mesi successivi.

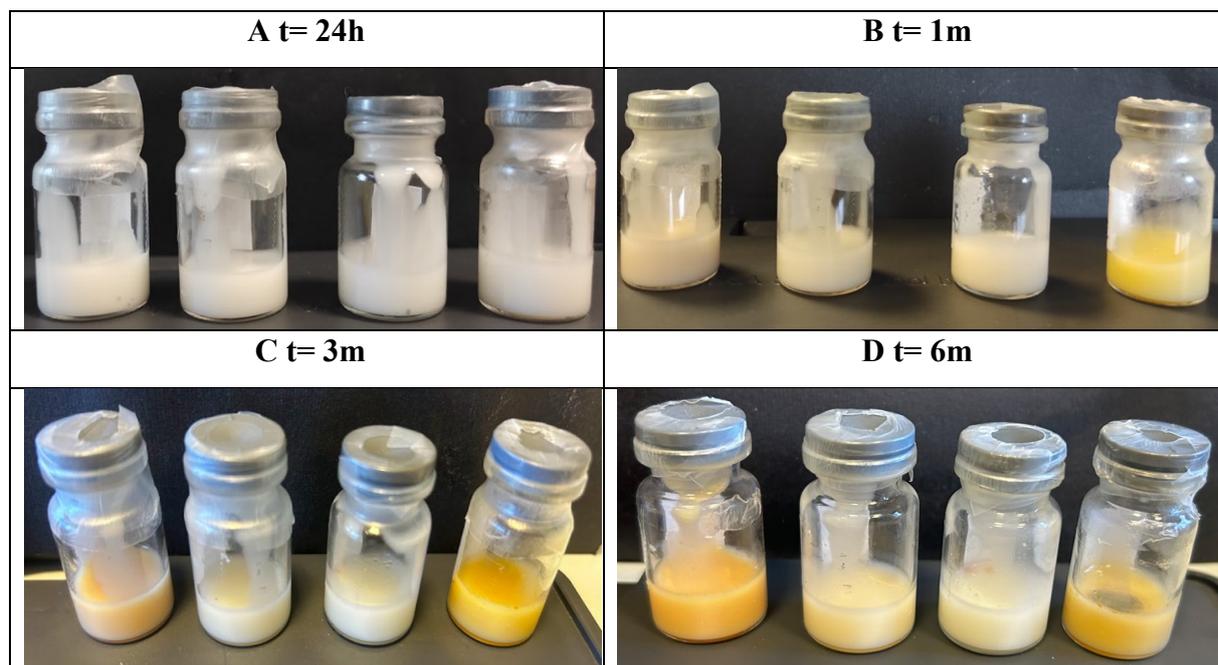


Figura 27: Foto di E3 a 25 °C alla luce (primo vial), a 25 °C al buio (secondo vial), a 4 °C (terzo vial) e 40 °C e 75% RH (quarto vial), ai tempi $t= 24h$ (A) e $t= 1m$ (B), $t= 3m$ (C), $t= 6m$ (D).

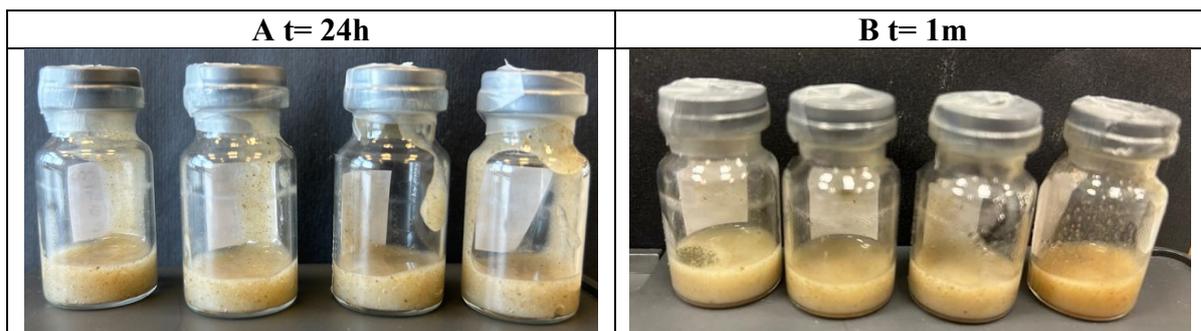


Figura 28: Foto di E4 a 25 °C alla luce (primo vial), a 25 °C al buio (secondo vial), a 4 °C (terzo vial) e 40 °C e 75% RH (quarto vial), ai tempi $t= 24h$ (A) e $t= 1m$ (B).

Lo stesso comportamento è stato osservato anche per E4, per il quale a 40 °C il colore è cambiato da marrone chiaro (Figura 28A, quarto *vial*), colorazione dovuta al Wint presente nella preparazione, ad arancione per il *vial* conservato (Figura 28B, quarto *vial*). La muffa è visibile soltanto del campione conservato a 25 °C alla luce al $t= 1m$ (Figura 28B, primo *vial*).

La formazione di muffa negli emulgeli era attesa in quanto si tratta di preparazioni prive di conservanti antimicrobici e con un contenuto di acqua superiore al 90%.

Non è stato ritenuto utile procedere con lo studio microbiologico (conta microbica) delle preparazioni in quanto gli emulgeli formulati sono stati successivamente convertiti in polveri.

Il cambiamento di colore degli emulgeli è da imputare all'ossidazione aerobica dei fitocannabinoidi a cannabinochinoidi. Il prodotto di ossidazione che si viene a formare dal CBD è il cannabidiolchinone (CBDQ) il quale determina una tonalità di colore dell'estratto tendente al rosso [Caprioglio D. *et al.*, 2020].

Inoltre, a $t= 3m$ è stato misurato il pH solo dell'emulgel E3, in quanto durante lo studio di stabilità era l'unico in cui non si era formata muffa visibile. I rispettivi valori erano 4,82 a 25 °C alla luce, 4,95 a 25 °C al buio, 5,55 a 4 °C e 4,77 a 40 °C (75% RH).

Confrontando il pH di E3 a $t= 24h$ ($5,16 \pm 0,06$) e a $t= 3m$, emerge che non si sono verificati cambiamenti significativi.

6.2. Polveri

In questo lavoro di tesi aliquote delle polveri SDE1, SDE2, SDE3 e SDE4 sono state conservate in frigo a 4 °C per valutarne la stabilità nel tempo (Figura 29).

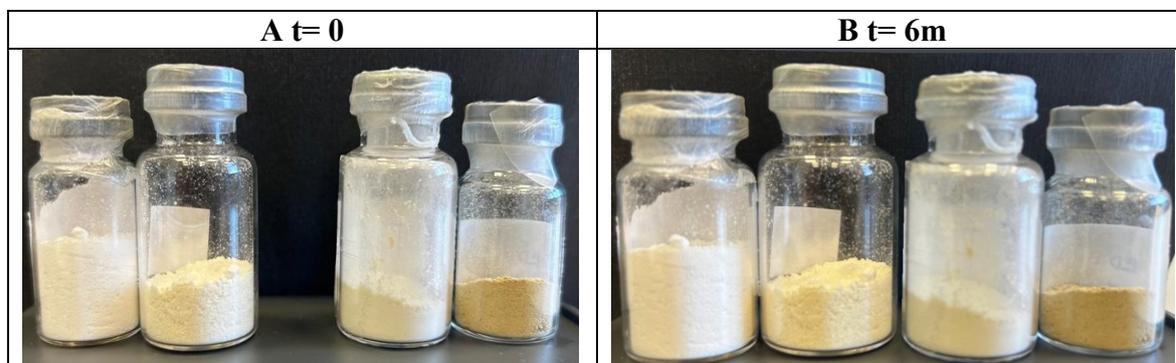


Figura 29: Foto di SDE1 (primo vial), SDE2 (secondo vial), SDE3 (terzo vial) e SDE4 (quarto vial), ai tempi $t=0$ (A) e $t=6m$ (B).

Dalla figura sopra riportata è possibile osservare che al $t=6m$, così come al $t=0$, non si sono verificati cambiamenti di colorazione né formazione di muffa visibile.

Come atteso, le polveri sono una forma più stabile nel tempo rispetto agli emulgeli.

7. Panel test

I risultati delle analisi sensoriali PT1 e PT2 condotte su 23 partecipanti a seguito dell'applicazione degli emulgeli addizionati di diverse fragranze sono stati rielaborati di seguito.

Nello specifico nelle Figure 32 e 33 sono stati riportati i risultati dell'analisi sensoriale PT1 e PT2 rispettivamente relativi all'odore ed espressi come media ponderata delle votazioni raccolte.

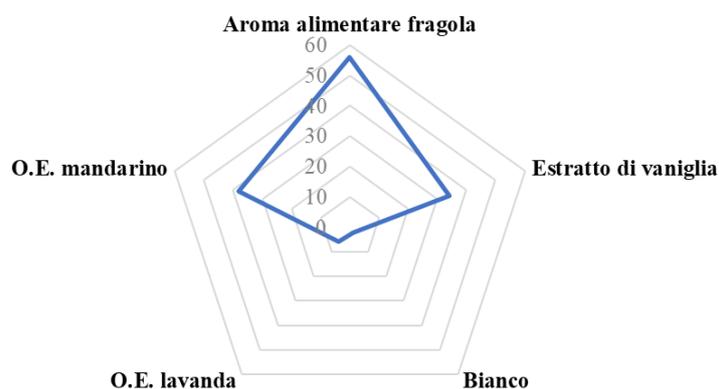


Figura 32: Risultati del panel test PT1.

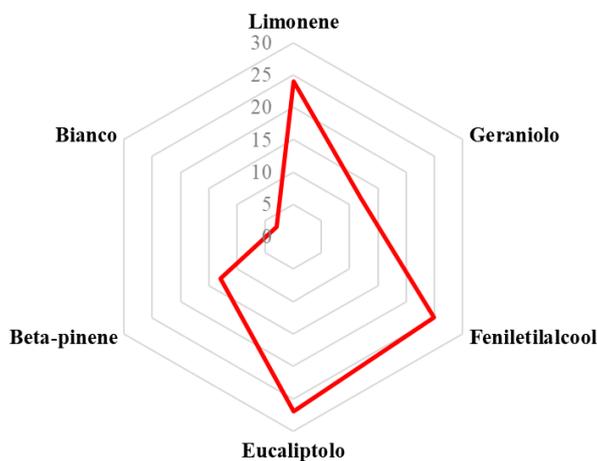


Figura 33: Risultati del panel test PT2.

Dai risultati si evince che sia nel caso di PT1 che in PT2 l'odore dell'emulgel privo di fragranza (Bianco) è risultato essere quello meno gradevole

La fragranza più apprezzata in PT1, con un punteggio di 56, è risultata essere l'aroma alimentare di fragola; un punteggio di 38 e 34 è stato ottenuto nel caso dell'olio essenziale di mandarino e dell'estratto di vaniglia. La profumazione meno apprezzata è risultata essere l'olio essenziale di lavanda, con un punteggio di 6.

Per l'analisi PT2, la profumazione più apprezzata è stata l'eucaliptolo con un punteggio di 27, seguito da feniletalcol e limonene con punteggi di 25 e 24. Beta-pinene e geraniolo hanno portato all'ottenimento di un punteggio di 13 e 12 rispettivamente.

Per quanto riguarda la *texture*, sia in PT1 che in PT2 20 partecipanti su 23 hanno considerato la consistenza degli emulgel molto gradevole e rinfrescante, mentre i restanti 3 li hanno reputati untuosi.

I volontari hanno espresso un giudizio anche in merito alla zona di applicazione. In PT1, 23 persone applicherebbero l'emulgel addizionato di aroma alimentare di fragola sul corpo e di queste 23, 9 lo applicherebbero anche sul viso.

In PT2, 13 persone applicherebbero l'emulgel addizionato di eucaliptolo sul corpo, 8 persone su corpo e viso, e 2 persone solo sul viso.

CONCLUSIONI

In questo lavoro sono stati formulati emulgeli per applicazione cutanea a base di un estratto di canapa industriale, del quale è stata accertata l'attività antiossidante, incorporato in quattro differenti fasi oleose.

Mediante *spray-drying* gli emulgeli, costituiti per oltre il 90% da acqua, sono stati convertiti in polvere. Le polveri sono forme fisicamente e microbiologicamente più stabili degli emulgeli, oltre che più semplici dal punto di vista logistico (confezionamento, stoccaggio e trasporto).

La ricostituzione con acqua di una delle polveri ha permesso di ottenere un emulgel caratterizzato da buona *texture* e caratteristiche chimico-fisiche e reologiche adatte all'applicazione cutanea.

Dal processo di *spray-drying* sono state ottenute polveri con proprietà di flusso accettabili e con rese comprese tra circa 20% e 50%, in linea con quelle attese dall'impiego di strumentazione su scala laboratorio. L'analisi termogravimetrica delle polveri ha confermato l'efficienza del processo di essiccamento.

Il miglioramento della scorrevolezza delle polveri e l'incremento della resa di essiccamento potranno essere ottenuti mediante la modulazione delle condizioni operative di *spray-drying*, come per esempio l'impiego di ugelli di atomizzazione di diametri differenti.

In vista dell'impiego delle polveri a base di estratto di canapa industriale come preparazioni topiche, dermatologiche o cosmetiche, e data la natura lipofila dell'estratto, sarà necessario prevedere la presenza, nella formulazione degli emulgeli da cui le polveri derivano, di conservanti antiossidanti.

BIBLIOGRAFIA

Aideco 2021. *Ingredienti naturali e sostenibili. Sempre più in crescita l'interesse del consumatore*. *Cosmetic Technology* 24(4), 64–67.

Ameri M., Maa Y-F. 2007. *Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations*. *Drying Technology* 24(6), 763–768. <https://doi.org/10.1080/03602550600685275>.

Aracri R., Mancini F., Salerno O. 2023. *Il diritto nella cosmesi*. I Edizione, Tecniche Nuove, 46–60.

Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., Skrzydlewska, E. 2019. *Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol*. *Antioxidants* 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>.

Aulton M.E., Taylor K.M.G. 2015. *Tecnologie farmaceutiche. Progettazione e allestimento dei medicinali*. IV Edizione, Edra.

Badarinath, A.V., Rao, K., Madhusudhana, C. C. 2010. *A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations*. *International Journal of PharmTech Research* 2(2), 1276-1285.

Bari, E., Perteghella, S., Rassu, G., Gavini, E., Petretto, G. L., Bonferoni, M. C., Giunchedi, P., Torre, M.L. (2023). *Sericin/crocetin micro/nanoparticles for nucleus pulposus cells regeneration: An “active” drug delivery system*. *Frontiers in Pharmacology* 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1129882>.

Bettiol F., Cecchi M., 2018. *Manuale delle preparazioni cosmetiche e dermatologiche*. IV Edizione, Tecniche nuove.

Bíró, T., Tóth, B.I., Haskó, G., Paus, R., Pacher, P. (2009). *The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities*. Trends in Pharmacological Sciences 30(8), 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.004>.

Caprioglio, D., Mattoteia, D., Pollastro, F., Negri, R., Lopatriello, A., Chianese, G., Minassi, A., Collado, J. A., Munoz, E., Tagliatalata-Scafati, O., & Appendino, G. (2020). *The Oxidation of Phytocannabinoids to Cannabinoquinoids*. Journal of Natural Products 83(5), 1711–1715. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01284>.

Cheng, N.-S., Zhao, K. (2017). *Difference between static and dynamic angle of repose of uniform sediment grains*. International Journal of Sediment Research 32(2), 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijsrc.2016.09.001>.

Colombo P., Catellani P.L., Gazzaniga A., Menegatti E., Vidali E., 2004. *Principi di tecnologie farmaceutiche*. II Edizione, Casa Editrice Ambrosiana.

Corte di giustizia dell'Unione europea, sentenza nella causa C-663/18, 19 novembre 2020.

Cuadari A., Gambaro G. Aromi solidi a base di cannabidiolo e metodo per la loro produzione - Patent IT202100020762A1, 2 febbraio 2023.

D'Agostini G., Mignini E., 2022. *Manuale del cosmetologo*. III Edizione, Tecniche Nuove, 871.

Dawidowicz, A. L., Olszowy-Tomczyk, M., Typek, R. (2021). *CBG, CBD, Δ9-THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ9-THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action*. Fitoterapia 152, 104915. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104915>.

De Almeida, D. L., Devi, L. A. (2020). *Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD*. Pharmacology Research & Perspectives 8(6). <https://doi.org/10.1002/prp2.682>.

Decisione (UE) 2019/70 della Commissione Europea, 11 gennaio 2019.

Decreto Ministeriale (DM) n. 157, 27 giugno 2024.

Decreto Ministeriale (DM) n. 194, 7 agosto 2023.

Decreto Ministeriale (DM) n. 801, 28 ottobre 2020.

Direttiva 76/768/CEE del Consiglio, 27 luglio 1976, concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relative ai prodotti cosmetici.

Farmacopea Europea Edizione, 11.5. 5_2024.

Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, F.U.I. XII Edizione. 2009.

Formato, M., Crescente, G., Scognamiglio, M., Fiorentino, A., Pecoraro, M. T., Piccolella, S., Catauro, M., Pacifico, S. (2020). *(-)-Cannabidiolic Acid, a Still Overlooked Bioactive Compound: An Introductory Review and Preliminary Research*. *Molecules* 25(11), 2638. <https://doi.org/10.3390/molecules25112638>.

Gazzetta Ufficiale n. L 132, 1° giugno 1996.

Grassi L., 2024. *Studio preformativo di estratti di canapa industriale per preparazioni farmaceutiche e cosmetiche*. Tesi di Laurea.

Guy C., Jakus, J., Portillo, M., Gvirtz, R., Ogen-Shtern, N., Silberstein, E., Ayzenberg, T., Rozenblat, S. (2023). *In vitro, ex vivo, and clinical evaluation of anti-aging gel containing EPA and CBD*. *Journal of Cosmetic Dermatology* 22(11), 3047–3057. <https://doi.org/10.1111/jocd.15815>.

Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., El Aouad, N. (2023). *A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities*. *Plants* 12(6), 1245. <https://doi.org/10.3390/plants12061245>.

Izzo, L., Castaldo, L., Narváez, A., Graziani, G., Gaspari, A., Rodríguez-Carrasco, Y., & Ritieni, A. (2020). *Analysis of Phenolic Compounds in Commercial Cannabis sativa L. Inflorescences using UHPLC-Q-Orbitrap HRMs*. *Molecules* 25(3), 631. <https://doi.org/10.3390/molecules25030631>.

Jafari S.M., Samborska K. 2021. *Spray drying for the retention of food bioactive compounds and nutraceuticals - 150th anniversary of spray drying*. *Drying Technology* 39 (12) 1773.

Yoo, E. H., & Lee, J. H. (2023). *Cannabinoids and Their Receptors in Skin Diseases*. *International Journal of Molecular Sciences* 24(22), 16523. <https://doi.org/10.3390/ijms242216523>.

Kirkbride, L., Humphries, L., Kozielska, P., Curtis, H. (2021). *Designing a suitable stability protocol in the face of a changing retail landscape*. *Cosmetics* 8(3), 64. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030064>.

Lee, H., Ahn, J., Kwon, A., Lee, E. S., Kwak, J., Min, Y. (2014). *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Apricot Seed*. *Phytotherapy Research* 28(12), 1867–1872. <https://doi.org/10.1002/ptr.5219>.

Maly, M., Benes, F., Binova, Z., Zlechovcova, M., Kastanek, P., Hajslova, J. (2023). *Effective isolation of cannabidiol and cannabidiolic acid free of psychotropic phytocannabinoids from hemp extract by fast centrifugal partition chromatography*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 415(19), 4827–4837. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04782-9>.

McMullen, R. L. (2024). *The benefits and challenges of treating skin with natural oils*. *International Journal of Cosmetic Science* 46(4), 553–565. <https://doi.org/10.1111/ics.12960>.

Mnekin, L., Ripoll, L. (2021). *Topical Use of Cannabis sativa L. Biochemicals*. *Cosmetics* 8(3), 85. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030085>.

NETZSCH, *Analyzing & Testing Thermal Stability in Pharmaceuticals*, webinar (2024).

Penazzi G., 2020. *Come sono fatti i cosmetici. Guida pratica alla lettura dell'INCI*. II Edizione, Edra.

Peng, J., Fan, M., An, C., Ni, F., Huang, W., Luo, J. (2022). *A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD)*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 130(4), 439–456. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13710>.

Perez, E., Fernandez, J. R., Fitzgerald, C., Rouzard, K., Tamura, M., Savile, C. (2022). *In Vitro and Clinical Evaluation of Cannabigerol (CBG) Produced via Yeast Biosynthesis: A Cannabinoid with a Broad Range of Anti-Inflammatory and Skin Health-Boosting Properties*. *Molecules* 27(2), 491. <https://doi.org/10.3390/molecules27020491>.

Picco, A., Segale, L., Miletto, I., Pollastro, F., Aprile, S., Locatelli, M., Bari, E., Torre, M.L., Giovannelli, L. (2023). *Spray-Dried Powder Containing Cannabigerol: A New Extemporaneous Emulgel for Topical Administration*. *Pharmaceutics* 15(12), 2747. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122747>.

Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009 sui prodotti cosmetici. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea.

Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009 sui prodotti cosmetici, Allegato (II/306). Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea.

Rock, E. M., Limebeer, C. L., Pertwee, R. G., Mechoulam, R., Parker, L. A. (2021). *Therapeutic Potential of Cannabidiol, Cannabidiolic Acid, and Cannabidiolic Acid Methyl Ester as Treatments for Nausea and Vomiting*. *Cannabis and Cannabinoid Research* 6(4), 266–274. <https://doi.org/10.1089/can.2021.0041>.

Safic-Alcan, *Texture*, webinar (2023).

Sakamoto K., 2017. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. I Ed., Elsevier Science, 267–269.

Sekvamuthukumar M., 2020. *Handbook on Spray Drying Applications for Food Industries*. I Ed., CRC Press, 33–34.

Sideris, A., Doan, L. v. (2024). *An Overview of Cannabidiol*. *Anesthesia & Analgesia* 138(1), 54–68. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000006584>.

Ternelli M. 2021. *Cosmetici alla canapa in Europa e Italia, normativa e spunti*. Farmagalenica, Informazione su Galenici e Farmacie che fanno Preparazioni Galeniche.

Torriani M. 2022. *La CBD-BEAUTY nel suo pieno sviluppo*. Beauty Horizons.

Utschick H. 1999. *Methods of Thermal Analysis*. I Ed. Perkin Elmer.

Vanti, G., Grifoni, L., Bergonzi, M. C., Antiga, E., Montefusco, F., Caproni, M., Bilia, A. R. 2021. *Development and optimisation of biopharmaceutical properties of a new microemulgel of cannabidiol for locally-acting dermatological delivery*. *International Journal of Pharmaceutics* 607, 121036. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121036>.

Xuelian C., Su, J., Wang, R., Hao, R., Fu, C., Chen, J., Li, J., Wang, X. 2023. *Structural Optimization of Cannabidiol as Multifunctional Cosmetic Raw Materials*. *Antioxidants* 12(2), 314. <https://doi.org/10.3390/antiox12020314>.

Yoo, E. H., Lee, J. H. 2023. *Cannabinoids and Their Receptors in Skin Diseases*. *International Journal of Molecular Sciences* 24(22), 16523. <https://doi.org/10.3390/ijms242216523>.

SITOGRAFIA

- <https://icea.bio>
- <https://www.ccpb.it>
- <https://www.ecocert.com>
- <https://www.eurobiolab.com>
- <https://canapamontana.it/blog/cbd-legale-italia/>
- <https://www.politicheantidroga.gov.it/>
- <https://temi.camera.it/nuove-raccomandazioni-oms-sulla-cannabis-accolte-dalla-commissione-droga-nazioni-unite>

- <https://www.salute.gov.it/portale/medicinaliStupefacenti/dettaglioNotizieMedicinaliStupefacenti>
- <https://www.ilsole24ore.com/art/cannabis-tar-lazio-accoglie-istanza-sospensione-decreto-cbd>
- <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/>
- <https://www.personalcarecouncil.org/about-us/>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/term=cbd+cosmetics+> (consultazione del 12 settembre, 2024)
- <https://incibeauty.com/it>
- https://assets.buchi.com/image/Operation-Manuals/B-290_it.pdf
- <https://www.spraydryer.it/>
- <https://www.perkinelmer.com/it/product/tga-4000>
- <https://www.alchemy-ingredients.com/ingredients/instathix>