

COSMETIC[®] TECHNOLOGY

RIVISTA DI SCIENZE COSMETOLOGICHE

ISSN 1127-6312 Bimestrale. Poste Italiane s.p.a. - Spedizione in Abbonamento Postale - D.L. 353/2003 (convertito in Legge 27/02/2004 n° 46) art. 1, comma 1, LO/MI



n.2 Marzo/Aprile 2019

Idratanti cutanei

CEO
EDITORE

Mentil nicotinato

Alto grado di assorbimento cutaneo e lento rilascio di vitamina B3 (niacina)

Gabriele Segalla¹, Silvana Giardina², Gioia Bizzaro²

¹Multichem R&D - segalla@multichem.it

²Complife Group

Parole chiave

Menthyl Nicotinate

Niacina

Vitamina B3

Mentolo

Agenti sensoriali

Riassunto

Il mentil nicotinato è un nuovo principio attivo sensoriale e multifunzionale, attivatore del microcircolo cutaneo, con dimostrata efficacia protettiva, antiossidante, antinquinamento, detox. In questo studio *in vitro* su un modello di epidermide umana ricostruita (RHE), viene esaminata la sua cinetica di rapida penetrazione attraverso la barriera cutanea e la sua conseguente idrolisi con liberazione di mentolo e niacina (vitamina B3) nell'arco delle 24 ore. Sono elaborate nei tempi sperimentali sia la curva di cessione totale di niacina risultante dall'idrolisi, sia quelle della sua diffusione graduale negli strati sottostanti, laddove essa si rende più disponibile ad interagire con le strutture biologiche dell'epidermide e del derma. È proprio grazie a questo rilascio lento (*time-release*) ed equimolare di niacina e di mentolo che si deve sia l'assenza di effetti irritativi rubefacenti (*niacin-flush*) propri di altri nicotinati, sia la tipica, gradevole e modulata sensazione prodotta dall'azione del mentil nicotinato sui termorecettori cutanei, da solo o in sinergia con altri agenti sensoriali.

Introduzione

Lo scopo del presente lavoro è caratterizzare e indagare nel dettaglio le capacità di penetrazione, attraverso la barriera cutanea, del principio attivo cosmetico mentil nicotinato (INCI: Menthyl Nicotinate) e la sua successiva graduale idrolisi, in un modello di epidermide umana ricostruita (RHE).

Si ipotizza infatti, sulla base di precedenti studi di funzionalità condotti *in vivo* su formulati contenenti questa sostanza, che, una volta applicata sulla pelle, penetri velocemente attraverso lo strato corneo e sia poi idrolizzata nei due costituenti originali: niacina e mentolo. Entrambi vengono lentamente rilasciati nelle zone sottostanti la barriera cutanea, risultando più facilmente disponibili ad interagire con le strutture biologiche dell'epidermide e del derma.

Menthyl Nicotinate

High rate of skin absorption and time-release delivery of Vitamin B3 (Niacin)

Summary

Menthyl nicotinate is a new multifunctional, sensory active ingredient that activates the microcirculation of the skin. It has been proven to be effective as an antioxidant, anti-pollutant, detoxifying and protective agent. This in vitro study on a reconstructed human epidermis (RHE) model investigates menthyl nicotinate's fast penetration kinetics through the skin, and how its subsequent hydrolysis releases menthol and niacin (vitamin B3) within 24 hours of its application. The total release of niacin was analyzed at different time points, and the release curve was plotted. Niacin slow diffusion in the underlying skin layers, where it interacts with the epidermal and dermal biological structures, was also studied. Such time-dependent release of niacin and menthol, in an equimolar ratio, prevents the niacin-flush effect that is usually observed with other nicotinate-based formulations. It also allows menthyl nicotinate to gradually interact with skin thermoreceptors, alone or in combination with other sensory agents, to provide a characteristic pleasurable and modulated effect.

Nello specifico, è stato condotto uno studio *in vitro* per valutare sperimentalmente il potenziale di assorbimento di una soluzione di mentil nicotinato (3% in Caprylic/Capric Triglyceride), caratterizzare la cinetica di penetrazione dell'ingrediente attraverso la pelle e studiare la cinetica di distribuzione dei costituenti nei diversi distretti cutanei in esame, mediante dosaggio della quota disponibile di niacina e relativi calcoli stechiometrici.

La niacina, nota anche come acido nicotinico, è stata descritta per la prima volta dal chimico austriaco Ugo Weidel nel 1873 nei suoi studi sulla nicotina. Weidel era riuscito a sintetizzarla ossidando la nicotina con acido nitrico.

Fu questo l'unico motivo per il quale la sostanza venne chiamata allora con il nome di acido "nicotinico", pur non avendo nessuna relazione, né biochimica né tossicologica, con il noto alcaloide del tabacco.

La scoperta che fosse proprio la carenza di niacina la causa della malattia denominata pellagra nell'uomo e *black tongue* (lingua nera) nel cane, avvenne solo molti anni più tardi, nel 1937, ad opera del chimico americano Conrad Arnold Elvehjem, che l'aveva isolata da un estratto deproteinizzato di fegato. Da allora venne classificata come la terza vitamina del gruppo B, appunto "vitamina B3" o "vitamina PP" (*Pellagra Preventing*).

Qualche anno dopo, nel 1942, l'American Medical Association, al fine soprattutto di evitare analogie infondate e illogiche tra gli effetti nocivi della nicotina e quelli terapeutici delle vitamine, propose un nome per così dire più commerciale e meno fuorviante: NIACIN, dalle prime due lettere di Nicotinic ACid e dalle ultime due di Vitamin.

La niacina ricopre un ruolo essenziale in tutto il mondo animale. Riduce la sintesi di trigliceridi e colesterolo, ha effetti benefici nella prevenzione di disturbi cardiovascolari, nel mantenimento dell'efficienza e funzionalità della pelle e del sistema nervoso, nel trattamento della schizofrenia e della depressione.

Nella pelle, una volta attraversata la membrana cellulare dei cheratinociti, essa dà luogo ad una complessa serie di reazioni biochimiche, che conducono alla sintesi di importanti coenzimi, tra cui il nicotinammide adenina dinucleotide (NAD⁺).

Il NAD⁺ interviene in centinaia di reazioni enzimatiche, quali ad esempio: processi di produzione di energia (ATP), reazioni metaboliche di ossido-riduzione, ciclo di Krebs, regolazione della segnalazione cellulare nel sistema immunitario, riparazione dei danni al DNA, rinnovamento delle cellule epiteliali, sintesi di lipidi essenziali (ceramidi) per la funzionalità della barriera cutanea, ecc.

Nel quadro di tali complesse azioni ed interazioni metaboliche, va collocata una delle attività forse più importanti della niacina, quella detossinante. La sua capacità di rimuovere sostanze xenobiotiche dal distretto cutaneo fu per la prima volta scoperta e descritta da L.R. Hubbard nel 1977 (1,2). Il metodo Hubbard, a base di niacina e altre vitamine in dosi crescenti, fu da allora studiato e adottato in numerosi casi di intossicazione causata da esposizione, anche prolungata, ad agenti chimici molto tossici e cancerogeni (3). Venne impiegato, per esempio, con risultati significativamente positivi, per la disintossicazione di alcuni soggetti appartenenti alle squadre di soccorso incaricate della bonifica dell'area contaminata del World Trade Center, dopo l'attentato dell'11 settembre.

Soggetti che avevano subito, in varia misura, esposizioni a sostanze chimiche altamente tossiche, come policlorobifenili (PCBs), dibenzofurani policlorurati (PCDFs), policlorodibenzodiossine (PCDDs), ecc. (4).

La niacina si è dimostrata un'efficace difesa non solo contro le aggressioni chimiche ma anche nei confronti delle radiazioni UV. Recenti studi hanno chiaramente evidenziato che l'incremento di NAD⁺, prodotto dalla niacina nei cheratinociti, è in grado di esercitare una significativa azione, sia preventiva che riparatrice, nei confronti dei danni indotti dall'eccessiva esposizione a radiazioni solari (5,6).

Di grande rilievo è anche l'azione balsamica e lenitiva del mentolo prodotto dall'idrolisi del mentil nicotinato. Il rilascio simultaneo ed equimolare di mentolo nella pelle contribuisce infatti a ridurre significativamente, se non ad eliminare del tutto, il potenziale rubefacente della niacina (il cosiddetto *niacin flush*), senza tuttavia inibirne le funzionalità biochimiche e vitaminiche. Infatti, a differenza di quanto accade per altri nicotinati (ad esempio metil nicotinato o etil nicotinato), non si riscontrano per l'estere mentilico, alle dosi d'uso raccomandate, fenomeni di eccessiva iperemia o irritazione o sensibilizzazione cutanea, come dimostrato dai numerosi test di sicurezza effettuati *in vitro* e *in vivo*, sia sulla sostanza pura che su formulati che la contengono anche a concentrazioni del 3-5%.

Con il presente studio si è evidenziato come il mentil nicotinato, grazie alla rapida cinetica di penetrazione transcutanea (circa il 90% in 24 ore) e alla concomitante e lenta cinetica di idrolisi, può costituire un nuovo ed interessante *carrier* topico di vitamina B3, a cessione graduale e ad azione protettiva, antiossidante, antiradicali liberi, detossinante, antinquinamento (7). Tale effetto per così dire "modulato" nel tempo, secondo i risultati ottenuti e qui appresso descritti, ha una durata che copre abbondantemente l'arco di un'intera giornata, contribuendo così a preservare e proteggere l'integrità e la funzionalità della barriera cutanea, con la conseguente riduzione di TEWL, per parecchie ore dopo l'applicazione. Ciò potrebbe essere di grande beneficio, soprattutto nei casi di pelli delicate e sensibili, per evitare danni provocati da eccessiva esposizione ai raggi solari o aggressioni da agenti chimici nocivi, particolarmente in aree urbane o industrializzate.

Meccanismo d'azione

Il mentil nicotinato è un estere (cioè il prodotto della reazione di un alcool, nel nostro caso il mentolo, con un acido carbossilico, nel nostro caso l'acido nicotinico) che, una volta

attraversata la barriera cutanea e giunto a contatto con l'enzima *esterasi*, inizia ad idrolizzarsi nei suoi due componenti originali, niacina e mentolo (**Fig.1**).

Uno degli aspetti forse più singolari di questo meccanismo di lenta idrolisi enzimatica del mentil nicotinato, è che esso agisce sulle terminazioni nervose cutanee producendo un effetto sensoriale delicato, prolungato e unico nel suo genere. La lenta e graduale cessione di mentolo infatti è responsabile della piacevole sensazione di fresco, percepibile già dopo pochi minuti e dovuta all'attivazione dei canali ionici TRPM8 e TRPA1, termorecettori del freddo (8). La componente *niacina* d'altro canto, oltre a costituire un benefico apporto vitaminico per la pelle, attiva i canali termorecettori sensibili al caldo (TRPV1, TRPV3), già alla temperatura corporea (9).

A seconda delle concentrazioni in gioco, il risultato di questa simultanea attivazione sinergica dei termorecettori del freddo (da parte del mentolo) e di quelli del caldo (da parte della niacina), viene perlopiù percepito come una particolare combinazione e alternanza di fresco e di caldo. Solitamente viene descritta con aggettivazioni molto diverse e del tutto soggettive, ma perlopiù compendiabili nelle seguenti: prolungata, profonda, intensa, fresca, frizzante, stimolante (ingl. *intense, deep, long-lasting fresh tingling*).

Materiali e Metodi

Per lo studio in questione sono stati utilizzati tessuti ricostruiti di epidermide differenziata umana (modello EpiDerm™), mantenuti in terreno specifico fornito dal produttore dei tessuti. In particolare, si tratta di un modello di epidermide ricostruita a partire da cheratinociti umani con superficie 0,6 cm². Le cellule vengono fatte crescere su un filtro di policarbonato in un medium chimicamente definito, ad interfaccia aria-liquido. Il tessuto ricostruito in queste condizioni è tale da riprodurre la struttura anatomica dell'epidermide *in vivo* e le sue proprietà funzionali, essendo un tessuto metabolicamente attivo. Le caratteristiche sopra elencate rendono il modello impiegato un'utile e valida alternativa alle classiche matrici impiegate per gli studi di penetrazione, con i vantaggi di lavorare su un modello standardizzato che garantisca risultati realistici e riproducibili senza implicazioni di natura etica

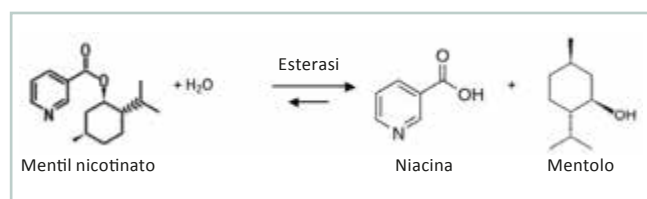


Figura 1 - Idrolisi del mentil nicotinato

(10-13). Sui tessuti sono stati eseguiti controlli di qualità da parte della casa produttrice che rivelano una normale istologia (assenza di alterazioni significative), vitalità cellulare conforme, integrità della barriera funzionale e assenza di microrganismi patogeni e malattie infettive. I tessuti sono stati mantenuti per tutta la durata del trattamento in piastre da 12 pozzetti con 1 ml di medium di mantenimento in condizioni standard di coltura (37°C, 95% UR, 5% CO₂). Il prodotto è stato testato in soluzione al 3% in Caprylic/Capric Triglyceride. 100 µL della soluzione (corrispondenti a 3000 µg di mentil nicotinato) sono stati applicati sull'epidermide per 24 ore.

Ai tempi sperimentali di 15/30 minuti, 1/2/4/8 e 24 ore rispettivamente, sono stati effettuati i dosaggi di mentil nicotinato (Nicomenthyl* - abbreviato in NM) e niacina sia nei tessuti (previa omogeneizzazione con *buffer* di lisi), sia nel medium sottostante. I dosaggi sono stati determinati mediante Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione (HPLC).

Sulla base dei dati sperimentali ottenuti dalle analisi HPLC e dal quantitativo di prodotto applicato, è stato eseguito il calcolo della percentuale di mentil nicotinato penetrata nell'epidermide, rispetto a quanto applicato sulla superficie del tessuto al tempo di inizio dello studio (T₀).

Risultati e Discussione

Nel modello sperimentale considerato, la penetrazione di mentil nicotinato (NM) raggiunge livelli molto elevati nel corso del periodo di studio monitorato (24 ore), pari a quasi il 90% della dose applicata (**Tab.1, Fig.2**). Si registra un valore di assorbimento nell'epidermide di circa il 50% della dose iniziale già dopo 30 minuti dall'applicazione. Non è stata riscontrata la presenza di mentil nicotinato indissociato nel medium sottostante l'epidermide, evidenziando così che l'estere rimane confinato nel distretto superficiale cutaneo durante tutto il periodo della prova.

Contestualmente all'incremento di NM nell'epidermide, si riscontra un progressivo aumento della quantità di niacina sia nell'epidermide che nel medium sottostante. La niacina infatti, a differenza della molecola del mentil nicotinato, è in grado di diffondere anche negli strati più profondi. Viene gradualmente rilasciata, nelle 24 ore successive all'applicazione, una quantità totale di 254 µg di niacina "libera" (*unbound*), pari dunque a circa il 18% della dose totale di niacina (1413 µg) inizialmente contenuta nell'estere (**Tab.2, Fig.3**).

In particolare, la niacina si distribuisce tra epidermide e medium sottostante in maniera crescente nel tempo in entrambi

*Nicomenthyl® è un marchio registrato di Multichem R&D Srl

i distretti. Infatti, nel corso del test, cambiano i rapporti di niacina nei due compartimenti analizzati (**Fig.3**). In particolare, nei primi tempi sperimentali, la quasi totalità di niacina si ritrova nel distretto superficiale, mentre, con il passare del tempo, aumenta sempre più in proporzione la quota di niacina nel medium sottostante l'epidermide. Si assiste pertanto ad una progressiva e graduale diffusione di niacina libera, in grado di raggiungere i tessuti sottostanti l'epidermide.

Basandosi su proiezioni e calcoli stechiometrici che prendono in considerazione le quote molarali di mentolo e di niacina presenti *ab imis* nel mentil nicotinato, e considerando la somma tra la quantità di mentil nicotinato indissociato ritrovata nell'epidermide e la quantità totale di niacina rilasciata nel modello sperimentale, si può facilmente calcolare quanto mentil nicotinato applicato sull'epidermide penetri e quanto venga idrolizzato nel tempo rilasciando i suoi costituenti, niacina e mentolo (**Tab.3, Fig.4**).

Conclusioni

I risultati ottenuti in questa indagine preliminare *in vitro* hanno dimostrato che NM ha una cinetica di penetrazione

molto veloce nel tempo e praticamente completa nell'arco delle 24 ore dall'applicazione. La concomitante lenta idrolisi dell'estere con formazione di niacina libera è progressiva e crescente; inizia già dopo 15 minuti dall'applicazione e prosegue nella prima ora quasi esclusivamente a livello degli strati superficiali dell'epidermide, per poi diffondere negli strati sottostanti, dove la niacina si rende più disponibile ad esercitare le proprie funzioni, come ampiamente descritto in letteratura. NM, idrolizzandosi, veicola negli strati sottostanti la barriera cutanea, nelle 24 ore, una quantità di niacina libera pari a circa il 18% della dose iniziale contenuta nell'estere. Tale risultato è indubbiamente significativo se comparato, per esempio, con il grado di assorbimento transcutaneo della comune nicotinamide (o niacinamide, un'altra forma di Vitamina B3) che, in 24 ore, è solo il 2,2% della dose applicata (**14**). Due sono quindi i meccanismi messi in evidenza da questo studio: la veloce cinetica di penetrazione di NM nel distretto epidermide, a cui segue un lento processo di idrolisi esterasica con rilascio graduale e crescente nel tempo di niacina, anche oltre il compartimento epidermico. Questo singolare meccanismo d'azione della molecola in studio è di sicuro interesse per la futura ricerca biochimica e cosme-

Assorbimento transcutaneo di 3000 µg di NM

Tempi sperimentali	NM omogenati µg	NM terreni µg	NM% penetrazione totale nell'epidermide (%)
15 min	605,0	-	20,2
30 min	1615,2	-	53,8
1 ora	1993,2	-	66,4
2 ore	2346,7	-	78,2
4 ore	2481,7	-	82,7
8 ore	2557,7	-	85,3
24 ore	2633,2	-	87,8

Tabella 1 - Quantità di attivo ritrovata nei diversi compartimenti sperimentali (omogenati e terreni) e relativa percentuale di penetrazione all'interno dell'epidermide

Cessione di niacina derivata da idrolisi di 3000 µg NM

Tempi sperimentali	Niacina omogenati µg	Niacina terreni µg	Niacina totale µg
15 min	19,2	1,3	20,5
30 min	43,7	4,8	48,5
1 ora	55,8	10,3	66,1
2 ore	89,1	16,7	105,9
4 ore	122,8	26,4	149,2
8 ore	150,7	41,2	191,9
24 ore	186,5	67,6	254,1

Tabella 2 - Quantità di niacina ritrovata nei diversi compartimenti sperimentali (omogenati e terreni)

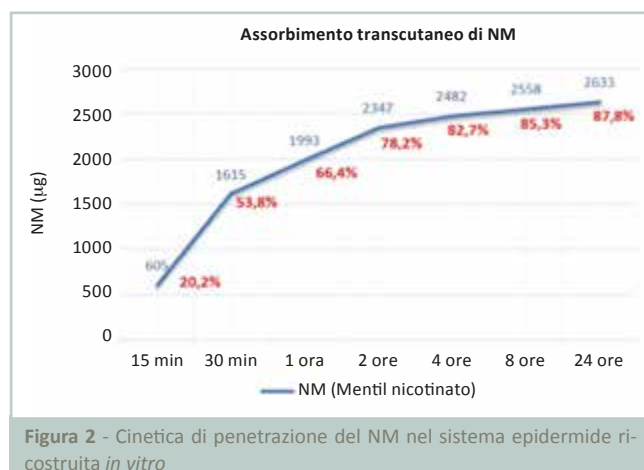


Figura 2 - Cinetica di penetrazione del NM nel sistema epidermide ricostruita *in vitro*

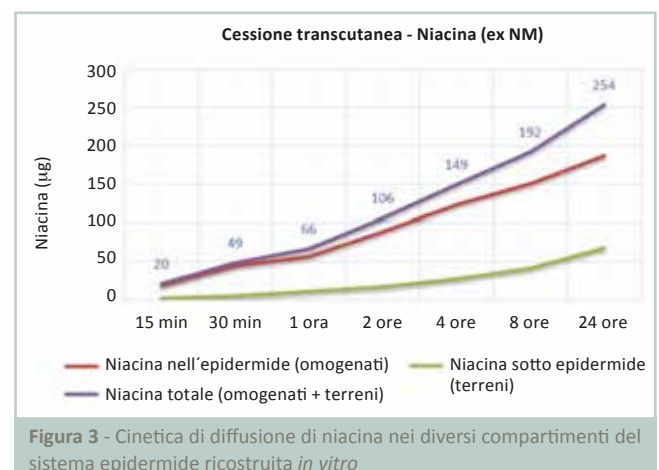


Figura 3 - Cinetica di diffusione di niacina nei diversi compartimenti del sistema epidermide ricostruita *in vitro*

NM - Assorbimento e idrolisi				
Tempi sperimentali	NM assorbito µg	NM non idrolizzato µg	Niacina totale libera µg	Mentolo totale libero µg
15 min	605,0	2956,5	20,5	26,0
30 min	1615,2	2897,0	48,5	61,6
1 ora	1993,2	2859,8	66,1	83,8
2 ore	2346,7	2775,2	105,9	134,4
4 ore	2481,7	2683,3	149,2	189,3
8 ore	2557,7	2592,5	191,9	243,6
24 ore	2633,2	2460,5	254,1	322,6

Tabella 3 - Quantità di NM assorbito, NM non idrolizzato, niacina e mentolo prodotti da idrolisi

tica, ma può già trovare un riscontro pratico e un impiego concreto nell'ambito delle proprietà cosmetiche funzionali, veicolanti e sensoriali dell'ingrediente, da solo o in sinergia con altri attivi. In particolare, il mentil nicotinato potrebbe essere visto come una sorta di modulatore biochimico, in grado cioè di modulare, prolungare la durata dell'effetto sensoriale di agenti riscaldanti (es. vanillil butil etere, capsaicina, ecc.), o rinfrescanti (es. mentil lattato, isopulegolo, ecc.), o vasodilatatori (es. L-arginina, metil nicotinato, etil nicotinato, ecc.), attenuandone nel contempo l'aggressività o il potere irritativo.

Ulteriori studi futuri potranno essere utili anche per approfondire l'aspetto relativo alla cinetica di idrolisi del mentil nicotinato, fino al suo completamento e alla ripartizione della niacina nei diversi compartimenti anatomici cutanei, andando a prolungare i tempi sperimentali oltre le 24 ore investigate in questa sperimentazione, al fine di caratterizzare ancor più nel dettaglio le interessanti e, per certi versi, sorprendenti proprietà funzionali di questo nuovo attivo cosmetico.

Bibliografia

- Prousky JE (2011) Niacin for Detoxification: A Little-known Therapeutic Use. *JOM* 26(2):85-92
- Hubbard LR (2002) Clear Body Clear Mind. Los Angeles (CA) Bridge Publications, p 13-75
- Schnare DW, Ben M, Shields MG (1984) Body Burden Reductions of PCBS, PBBs and Chlorinated Pesticides in Human Subjects. *Ambio* 13(5/6):378-380
- Dahlgren J, Cecchini M, Takhar H, Paepke O (2007) Persistent organic pollutants in 9/11 World Trade Center rescue workers: reduction following detoxification. *Chemosphere* 69(8):1320-1325
- Benavente CA, Jacobson MK, Jacobson EL (2009) NAD in Skin: Therapeutic Approaches for Niacin. *Current Pharmaceutical Design* 15(1):29-38
- Lin F, Xu W, Guan C *et al* (2012) Niacin protects against UVB radiation-induced apoptosis in cultured human skin keratinocytes. *Int J of Mol Med* 29:593-600
- Segalla G, Giardina S, Bizzaro G (2018) Nicomethyl®: Cessione transcutanea di niacina ed efficacia antinquinamento, detox, antiossidante. *Cosmetic Technology* 21(5):28-34
- Leffingwell JC (2009) Cooling Ingredients and Their Mechanism of Action. In: *Handbook of Cosmetic Science and Technology*, 3rd Informa Healthcare, 661-675
- Ma L, Lee BH, Clifton H, Schaefer S, Zheng J (2015) Nicotinic Acid is a Common Regulator of Heat-Sensing TRPV1-4 Ion Channels. *Sci Rep* 5:8906. doi:10.1038/srep08906
- OECD 428 (2004) Skin Absorption: *in vitro* Method. In: *OECD guideline for the testing of chemicals*
- Abd E, Yousef SA, Pastore MN *et al* (2016) Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin Pharmacol* 19(8):163-176
- Klausner M, Sheasgreen J, Kubilus J, Hayden P (2009) Long term reproducibility of epiderm, an epidermal model for dermal testing and research. *MatTek website reference* 355
- Schäfer-Korting M, Mahmoud A, Lombardi Borgia S *et al* (2008) Reconstructed epidermis and full-thickness skin for absorption testing: influence of the vehicles used on steroid permeation. *Altern Lab Anim* 36(4):441-452
- Feldmann RJ, Maibach HJ (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J of Invest Derm* 54(5):399-404

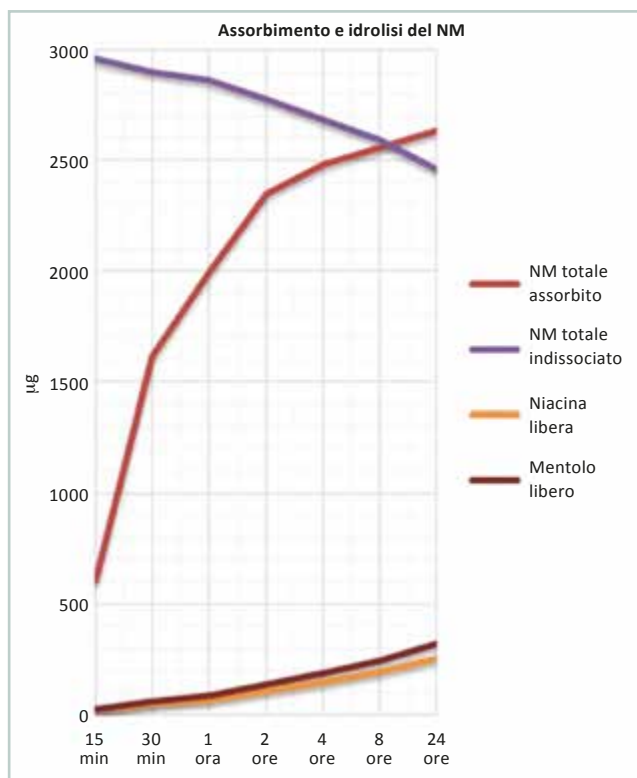
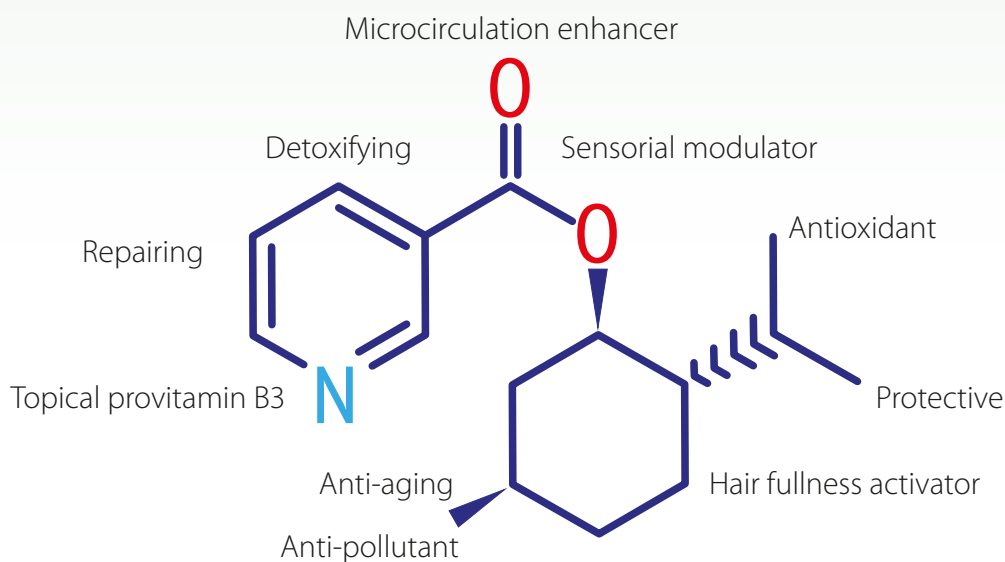


Figura 4 - Cinetica di penetrazione del NM e sua concomitante idrolisi in niacina e mentolo

nicomenthyl[®]

menthyl nicotinate

1 MOLECULE - 10 BENEFITS



The unique multifunctional sensorial active