



Foto di Dave Thomas

Perilla frutescens. Negli ultimi anni, questa specie è stata studiata in modelli animali e in vitro per il potenziale ruolo degli estratti di foglie nella dermatite atopica e nei danni della pelle indotti dai raggi UV.

Attività del fitocomplesso biotecnologico di *Perilla frutescens* (L.) Britton nel preservare l'integrità della mucosa vaginale mediante un effetto anti-infiammatorio e protettivo della barriera cutanea

I risultati presentati in questo articolo evidenziano che il fitocomplesso di perilla ha le potenzialità per essere un ingrediente eccellente in ambito cosmetico, nelle preparazioni per uso topico, come nella cura e igiene intima, dove ha mostrato una buona attività nel preservare l'integrità della mucosa vaginale, specialmente in condizioni vulnerabili come la menopausa.

- * **Giovanna Rigillo**
- ** **Giovanna Pressi**
- *** **Paolo Governa**
- **** **Vittoria Borgonetti**
- ***** **Giulia Baini**
- ** **Chiara Guarnerio**
- ** **Oriana Bertaiola**
- ** **Marco Frigo**
- ** **Matilde Merlin**
- ***** **Roberto Zambonin**
- ***** **Stefano Pandolfo**
- ***** **Marco Biagi**

Introduzione

Perilla frutescens (L.) Britton, nota anche come Shiso o semplicemente Perilla, è una specie erbacea annuale appartenente alla famiglia delle Lamiaceae, ampiamente coltivate in Asia e utilizzate come piante ornamentali, aromatiche e medicinali. *P. frutescens* ha importanza storica nella medicina asiatica, ma è nota nella fitoterapia moderna principalmente per trattare sintomi dell'allergia stagionale [1]. Negli ultimi anni, questa specie è stata studiata in modelli animali e *in vitro* per il potenziale ruolo degli estratti di foglie nella dermatite atopica [2] e nei danni della pelle indotti dai raggi UV [3]. Gli effetti biologici delle preparazioni di *P. frutescens* sono stati associati al suo fitocomplesso polifenolico particolarmente ricco di acido rosmarinico (AR) [4]. L'AR, infatti, ha dimostrato di avere diverse attività protettive, principalmente volte a contrastare lo stress ossidativo cellulare e la produzione di marcatori infiammatori [5], oltre a contribuire all'effetto an-

tiasmatico, in associazione con l'apigenina [6]. Come riportato da Yan e co-autori [7], l'AR (fino all'1,57%), oltre alla perillaldeide e al perilchetone, potrebbe essere considerato come un marcatore chimico delle foglie della specie e delle loro diverse preparazioni, anche se è stata osservata una grande variabilità in campioni di diversa origine. Ad oggi, non esiste una monografia ufficiale in farmacopea e non sono stati pubblicate indicazioni su saggi chimici per l'analisi di *P. frutescens*; come conseguenza di questi importanti limiti, e considerando che Perilla è utilizzata soprattutto nel settore degli integratori alimentari e cosmetici [8], la standardizzazione delle preparazioni di Perilla utilizzate a fini salutistici non è ancora stata raggiunta. Un approccio per ottenere fitocomplessi a

base di prodotti naturali esenti da contaminanti, standardizzati chimicamente e in quantità industriali, è quello di utilizzare le colture cellulari vegetali *in vitro*; questa tecnologia consente di risolvere i problemi legati alla variabilità dei prodotti erboristici, in quanto fornisce ai preparati un contenuto controllato di principi attivi e un alto profilo di riproducibilità e standardizzazione. Per circa 10 anni, la ricerca scientifica ha sviluppato e studiato la tecnologia delle colture cellulari vegetali *in vitro* per ottenere prodotti naturali biologicamente attivi [9, 10], ma la sfida attuale è quella di produrre fitocomplessi altamente standardizzati che potrebbero fornire il fondamentale effetto multitarget e sinergico di metaboliti secondari, che è alla base della fitoterapia odierna. In que-

sto lavoro, per la prima volta, è stata eseguita la produzione e la standardizzazione di un fitocomplesso biotecnologico di *P. frutescens* (PFP), ottenuto da colture cellulari vegetali, monitorando il contenuto di AR e antocianidine. Scopo di questo lavoro è stato sviluppare un fitocomplesso chimicamente standardizzato in grado di contrastare disturbi che interessano l'epitelio della pelle, tra cui le mucose, e quindi un buon candidato per applicazioni topiche.

I disturbi dermatologici minori sono molto spesso sottovalutati e hanno importanti limiti farmacologici che la ricerca scientifica cerca di affrontare. Tra questi, l'atrofia della mucosa vaginale rappresenta una delle conseguenze più caratteristiche che accompagnano il periodo della menopausa, con un grande im-



Foto di farkomer

Le diverse colorazioni delle foglie di *Perilla frutescens*, nelle varie fasi della crescita della pianta. La pianta ha importanza storica nella medicina asiatica, ma è nota nella fitoterapia moderna principalmente per trattare sintomi dell'allergia stagionale.

patto sulla qualità della vita delle donne [11-13]. Il presente lavoro mira a sviluppare e valutare la sicurezza e l'efficacia del nuovo fitocomplesso biotecnologico PFP indagando le sue proprietà biologiche. Per farlo, abbiamo pianificato il nostro studio in un progetto sperimentale costituito da tre fasi. Nella prima fase, abbiamo testato l'attività del PFP sull'infiammazione della pelle e nel mantenimento della barriera cutanea, studiando i meccanismi cellulari e molecolari che sostengono l'effetto. Nella seconda fase, abbiamo valutato gli effetti irritanti e idratanti del PFP su una mucosa vaginale 3D ricostruita *in vitro*; infine, nella terza fase, secondo la normativa che consente di testare gli ingredienti cosmetici, abbiamo eseguito una preliminare osservazione clinica in 30 volontari sani in pre- o post-menopausa per valutare l'idratazione vaginale, elasticità ed estensibilità dopo l'applicazione di una preparazione cosmetica contenente PFP.

Materiali

Coltura cellulare di Perilla frutescens

In questo studio, le piante di *Perilla frutescens* L. Britton utilizzate come materiale vegetale di partenza sono state certificate e acquistate presso il vivaio "Le Georgiche", Brescia. L'autenticazione delle specie botaniche di *P. frutescens* è stata garantita e confermata attraverso analisi di biologia molecolare (DNA fingerprint) eseguite in collaborazione con il Parco Tecnologico Padano, Lodi, Italia [14]. Le giovani foglie di *P. frutescens* sono state lavate sotto acqua corrente e sterilizzate attraverso un trattamento sequenziale in etanolo 70% (v/v), acqua per circa 1 min, soluzione di ipoclorito di sodio 2% (v/v), 6-14% cloro attivo e Tween-20 allo 0,1% (v/v) in acqua per 2-3 minuti

e, infine, almeno 3 lavaggi con acqua sterile. Il tessuto vegetale sanificato è stato tagliato in minuscoli frammenti (espanti) e depositato in capsule Petri contenenti terreno di coltura nutritivo solidificato Gamborg B5 [15] con diverse combinazioni e concentrazioni di regolatori della crescita delle piante (acido diclorofenossiacetico 2,4 con e senza 6-benzilaminopurina, acido 2,4 diclorofenossiacetico con e senza chinetina, acido 1-naftalenacetico con e senza chinetina, acido 3-indolacetico con e senza chinina, acido 1-naftalenacetico e acido 3-indolacetico con e senza chinetina e picloram con e senza 6-benzilaminopurina) e incubato a 25°C al riparo dalla luce. Il più alto tasso di crescita del callo è stato osservato utilizzando il mezzo solido Gamborg B5 integrato con saccarosio 20 g/L, Plant Agar 0,9% (p/v), acido 1-naftalenacetico (NAA) 0,5 mg/L, acido 3-indolacetico (IAA) 1 mg/L e pH corretto a 6,5 (terreno di Perilla). I calli coltivati su terreno di Perilla sono stati sottoposti a subcultura per almeno sei mesi, fino a quando sono diventati friabili e omogenei, con un tasso di crescita costante (linea cellulare stabile di *P. frutescens*). La sospensione cellulare è stata generata trasferendo 10% (p/v) di callo selezionato in 250 ml di mezzo di coltura liquido Gamborg B5 integrato con saccarosio 20 g/L, NAA 0,5 mg/L e IAA 1 mg/L. Il pH è stato regolato a 6,5 prima della sterilizzazione in autoclave (terreno liquido Perilla). Le sospensioni sono state mantenute a 25°C, in condizioni di buio, in costante agitazione a 120 rpm e sono state subcoltivate in un nuovo terreno liquido ogni 14 giorni di crescita. Successivamente, per produrre grandi quantità di biomassa, la coltura cellulare in sospensione è stata trasferita e adattata alla crescita in un bioreattore di di-

mensioni progressivamente crescenti (volume 3L e 5L), con una quantità di sospensione cellulare inoculata nel mezzo liquido pari al 12% (v/v). Per aumentare il contenuto di acido rosmarinicco (AR) e antociani totali, dopo 14 giorni di crescita in mezzo liquido, la sospensione cellulare è stata trasferita in un terreno liquido finale (Gamborg B5 con aggiunta di saccarosio 50 g/L, NAA 0,3 mg/L e AIA 0,8 mg/L). Il pH è stato regolato a 5,9 prima della sterilizzazione in autoclave (mezzo liquido finale di Perilla). La coltura in sospensione è stata coltivata per un ciclo di coltura di 21 giorni in una camera climatica a 25°C in agitazione costante a 120 rpm e in condizioni di buio.

Preparazione del fitocomplesso di P. frutescens

Dopo 21 giorni di crescita nel terreno liquido finale, a 25°C e al buio, la sospensione cellulare di *P. frutescens* è stata filtrata (filtro 50 Qm) e il terreno liquido è stato eliminato. Le cellule filtrate sono state lavate con il doppio del volume di soluzione salina (0,9% v/v NaCl in acqua sterile), addizionata con acido citrico 1,5% (p/p), e poi omogeneizzate con ultraturrax a 15.000 rpm per 20 min. La biomassa di cellule omogeneizzate è stata essiccata utilizzando un Mini Spray Dryer (BUCHI-B290) per ottenere una polvere di PFP ad alto contenuto di AR e antocianidine [16].

Risultati

1. Produzione del fitocomplesso Perilla frutescens da una linea cellulare selezionata e analisi chimica

Una linea cellulare stabile di *P. frutescens* è stata ottenuta utilizzando il terreno di coltura solido Perilla (Gamborg B5 medio integrato con 20 g/L di saccarosio, 0,9% (p/v) di Agar vegetale, 0,5 mg/L di NAA, 1 mg/L di IAA

a pH 6,5). Dopo sei mesi in questo terreno solido selezionato, la linea cellulare di *P. frutescens* si presenta di colore porpora, con una consistenza friabile e un alto tasso di crescita (subcoltura in terreno solido fresco ogni 21 giorni) (Figura 1a). La colorazione con diacetato di fluoresceina ha mostrato la morfologia cellulare e la vitalità delle cellule vegetali mantenute in un terreno di coltura solido ottimizzato per la crescita delle cellule di perilla (Figura 1b, c). Il contenuto di RA, polifenoli totali e antocianidine nella linea cellulare è stato ottimizzato utilizzando un terreno di coltura liquido finale con un contenuto più elevato di saccarosio (50 g/L) e una minore concentrazione di ormoni della crescita (NAA 0,3 mg/L e IAA 0,8 mg/L). Le cellule di Perilla cresciute in terreno di coltura liquido finale sono state utilizzate per preparare il PFP. Per misurare il contenuto di AR, polifenoli totali e antocianidine nel PFP, è stata eseguita l'analisi UPLC-DAD. Il cromatogramma UPLC-DAD registrato a 330 nm è mostrato nella Figura 2. Il contenuto di polifenoli totali, identificati dai loro spettri caratteristici ed espressi come equivalenti di RA, era $2,35 \pm 0,16\%$ p/p; il contenuto di AR, calcolato misurando l'area di picco al tempo di ritenzione 7,5, era $2,03 \pm 0,16\%$ p/p. Il contenuto di antocianidine totali identificate

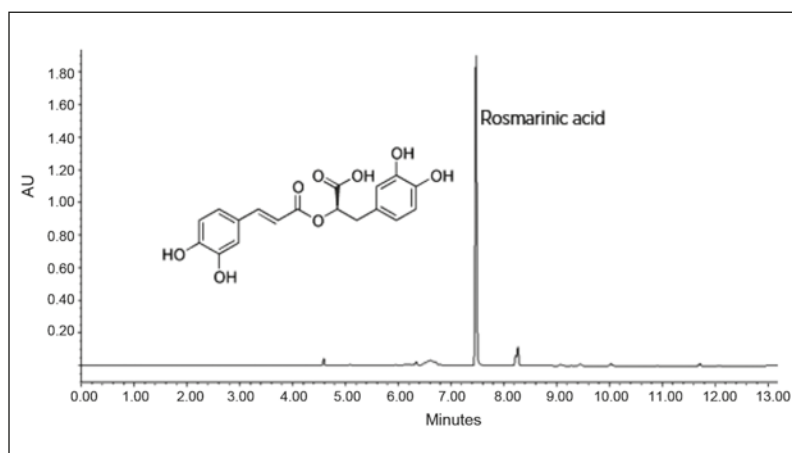


Figura 2. Cromatogramma UPLC-DAD dell'estratto di *Perilla frutescens* (L.) Britton registrato a 330 nm. AR, che eluisce a 7,5 min, rappresenta il componente principale. AR - acido rosmarinico.

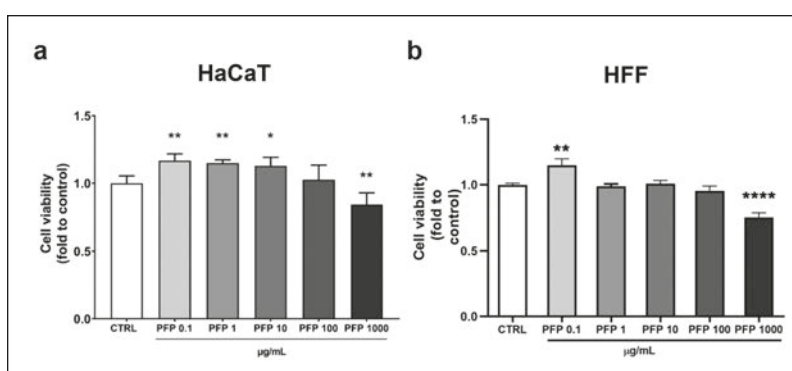


Figura 3. Analisi di vitalità cellulare mediante saggio CCK-8 su cellule HaCaT (a) e HFF (b) trattate con PFP alle concentrazioni di 0,1, 1, 10, 100 e 1000 µg/ml per 24h. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD. I dati sono stati analizzati mediante un'analisi one-way ANOVA seguita da test di confronti multipli Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ rispetto a CTRL.

dal loro spettro caratteristico con λ_{max} a 520 nm ed espresso come equivalente di cianidina-3-O-glucoside era $0,10 \pm 0,02\%$ p/p.

2. Effetto del PFP sulla vitalità dei cheratinociti e dei fibroblasti umani

Il primo obiettivo dello studio ha riguardato la valutazione dell'effetto del PFP sulla vitalità dei cheratinociti (HaCaT)

e dei fibroblasti (HFF), le principali popolazioni cellulari che compongono rispettivamente l'epidermide e il derma, la cui interazione è fondamentale per l'omeostasi e la rigenerazione cutanea. Le cellule HaCaT e HFF sono state trattate con diverse concentrazioni di PFP per 24h e la citotossicità è stata studiata attraverso la misurazione del metabolismo cellulare utilizzando il saggio CCK-8. L'analisi statistica ha indicato che il PFP solo alla concentrazione di 1000 µg/mL ha ridotto significativamente la vitalità cellulare sia nelle cellule HaCaT che HFF (ANOVA: HaCaT: $p = 0,0063$; HFF: $p < 0,0001$ vs. CTRL) (Figura 3a, b). Sulla base di questi dati, le analisi successive sono state effettuate utilizzando le concentrazioni non citotossiche (1, 10 o 100 µg/ml).

3. Il PFP non stimola la produzione di pro-collagene I ed el-

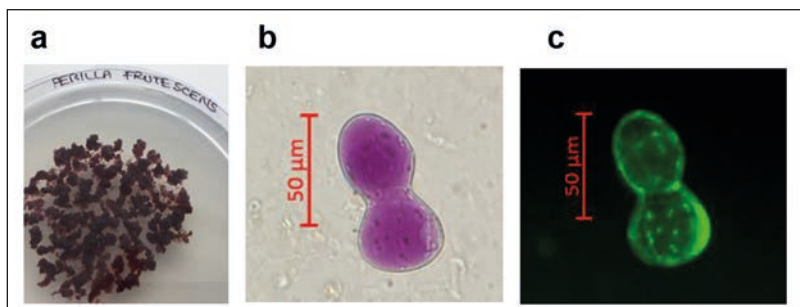
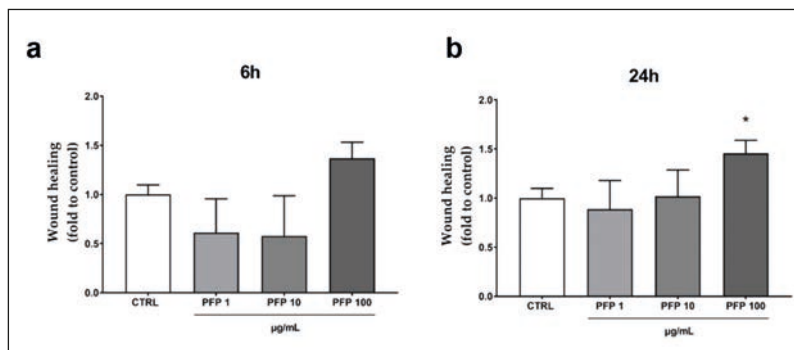


Figura 1. Coltura cellulare di *Perilla frutescens* (L.) Britton mantenuta in terreno di coltura solido di perilla (a), immagini ottiche di cellule di *Perilla frutescens* osservate dal microscopio ottico AXIO-Imager A2 (ZEISS), in modalità campo luminoso (b) e dopo colorazione con diacetato di fluoresceina (c). Scala: 50 µm.



Perilla frutescens (L.) Britton, nota anche come Shiso o semplicemente Perilla, è una specie erbacea annuale appartenente alla famiglia delle Lamiaceae, ampiamente coltivate in Asia.

Figura 4: Saggio di wound healing in cellule HaCaT trattate con PFP (1, 10, 100 µg/mL) per 6 ore (a) e 24 ore (b) o non trattate (CTRL). Ogni colonna rappresenta la media±SD. I dati sono stati analizzati mediante on-way ANOVA seguita da test di confronti multipli Tukey: *p<0,05 vs. CTRL.



stina nei fibroblasti ma migliora la capacità di migrazione dei cheratinociti

La riepitelizzazione delle ferite cutanee comporta una serie ordinata di eventi in cui i fibroblasti producono e organizzano i componenti della matrice extracellulare (ECM) per riformare la membrana basale sotto lo strato basale epidermico, mentre i cheratinociti migrano, proliferano e si differenziano

per ripristinare la funzione barriera [17]. Il collagene e l'elastina sono le proteine più abbondanti che compongono la ECM e sono prodotte dai fibroblasti. Per studiare la possibile attività del PFP sulla riparazione della pelle, abbiamo prima analizzato l'effetto del trattamento PFP sulla capacità dei fibroblasti di produrre collagene ed elastina. Mediante test ELISA, è stato misurato il rilascio di pro-colla-

gene I ed elastina in cellule HFF trattate con PFP (1, 10, 100 µg/ml) per 24h. Non sono state osservate differenze nei livelli di pro-collagene I ed elastina tra le cellule trattate e quelle di controllo. In secondo luogo, abbiamo valutato l'impatto del PFP sulla capacità di migrazione dei cheratinociti in un modello *in vitro* di wound healing. È stata creata una ferita artificiale sul monostrato confluyente di cellule e la capacità dei cheratinociti di chiudere la ferita è stata monitorata misurando l'area della ferita a 6h e 24 h dopo il trattamento con PFP (1, 10, 100 µg/ml). L'analisi del test ha rivelato un effetto del fitocomplesso (100 µg/ml) nello stimolare la migrazione di HaCaT dopo 6h, e in maggior misura dopo 24h, rispetto alle cellule di controllo (Figura 4a, b). Infatti, sebbene non statisticamente significati-

vo, l'aumento della migrazione dei cheratinociti prodotta dal PFP (100 µg/ml) a 6h è stato di circa il 35% rispetto al controllo (Figura 4a). Dopo 24h, il tasso è migliorato significativamente di oltre il 40% (ANOVA: $p=0,0452$ vs. CTRL) (Figura 4b). Alle concentrazioni più basse, il PFP non ha mostrato alcuna attività, né a 6h, né a 24h.

4. Il PFP contrasta la risposta infiammatoria dei cheratinociti riducendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie

Con l'obiettivo di valutare l'effetto del PFP in una condizione di pelle infiammata, abbiamo valutato diversi modelli *in vitro* di risposta infiammatoria. In primo luogo, abbiamo settato un modello *in vitro* di epidermide infiammata stimolando i cheratinociti con fattori rilasciati dai monociti (THP-1) infiltranti attivi, precedentemente stimolati dall'esposizione all'endotossina batterica lipopolisaccaride (LPS) (LCTM: *LPS-conditioned THP-1 medium*). Secondo il test di vitalità cellulare, le cellule HaCaT sono state trattate per 24h con PFP alle concentrazioni non tossiche (1, 10, 100 µg/ml) e contemporaneamente esposte a LCTM (*LPS-conditioned THP-1 medium*). Per garantire l'efficacia dello stimolo infiammatorio, i livelli proteici delle citochine pro-infiammatorie TNF- α , IL-6 e IL-1 β sono stati misurati mediante saggio ELISA nelle cellule HaCaT trattate. Dopo 24h di esposizione, TNF α è risultata essere la citochina più sovraregolata con un aumento significativo dei suoi livelli di 10 volte rispetto al gruppo di controllo (ANOVA: $p<0,0001$ vs. CTRL) (Figura 5a). Anche la produzione di IL-1 β e IL-6 è aumentata significativamente rispetto alle cellule non stimolate (ANOVA: IL-1 β $p = 0,0003$, IL-6 $p = 0,0148$ vs CTRL) (Figura 5a). Il trattamento con PFP è stato in grado di

contrastare gli alti livelli di TNF- α , IL-6 e IL-1 β indotti da LCTM. Infatti, l'analisi statistica ha rivelato che, nelle cellule esposte al mezzo condizionato, il trattamento con PFP alla concentrazione di 100 µg/ml ha impedito l'aumento dei livelli di TNF- α , IL-1 β e IL-6 (*post hoc*: TNF- α $p < 0,0001$, IL-1 β $p = 0,0026$, IL-6 $p = 0,0468$, vs. LCTM) (Figura 5a). A concentrazioni di 1 e 10 µg/ml, il PFP si è rivelato inefficace. La quantificazione del TNF- α , la citochina più regolata, è stata valutata in cellule HaCaT trattate con PFP (100 µg/ml) ed esposte direttamente a LPS (1 µg/ml) per 24h. L'analisi

ha mostrato un aumento significativo dei livelli di TNF- α nelle cellule HaCaT stimolate con LPS rispetto ai controlli (ANOVA: $p = 0,0091$ vs. CTRL) (Figura 5b). Il trattamento con PFP da solo non ha avuto un impatto sulla produzione di TNF- α , mentre nelle cellule stimolate con LPS, ha contrastato l'aumento dei livelli di TNF- α (*post hoc*: $p<0,05$ vs LPS) (Figura 5b). Abbiamo ulteriormente studiato l'effetto della PFP nel modulare il rilascio di citochine valutando la risposta immunitaria dei monociti attivi. Le cellule THP-1 sono state trattate con PFP (1, 10, 100 µg/ml) in concomitanza con LPS



Essencia

NATURAL FRAGRANCE, SWISS DESIGN



100%
FRAGRANZE
NATURALI



OLI
ESSENZIALI
DI ALTA GAMMA



PROFUMI
CREATI
SU MISURA

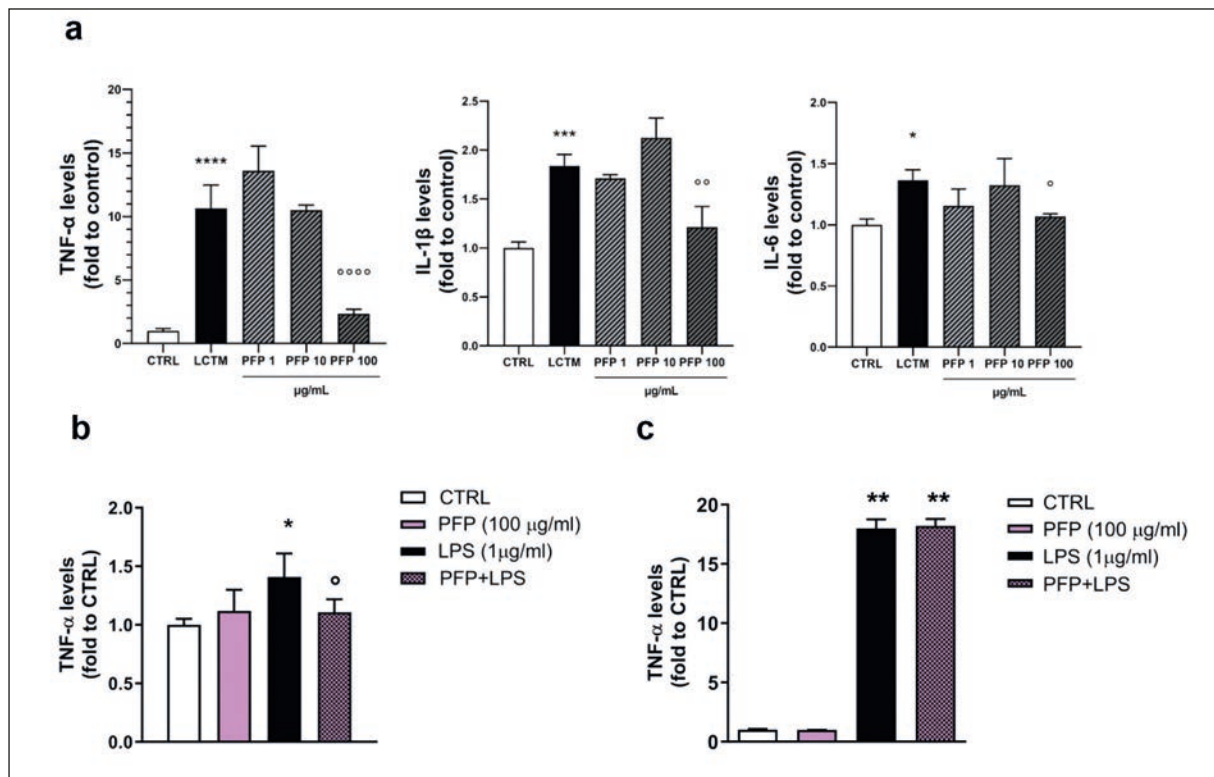
Creazione di miscele e di fragranze innovative

Essencia - distribuito in Italia da Carlo Sessa SpA,
Via Venezia 39, 20099 Sesto San Giovanni (Mi)
+39 02 240 20 51 - info@carlo sessa.it - www.carlo sessa.it



CARLO SESSA
PHARMA - FOOD & COSMECEUTICAL INGREDIENTS

Figura 5. Effetto del trattamento con PFP (1, 10, 100 µg/ml) sul rilascio di (a) TNF-α, IL-6 o IL-1β analizzato mediante saggio ELISA in cellule HaCaT esposte a terreno THP-1 condizionato da LPS per 24h (LCTM); (b) TNF-α in cellule HaCaT stimulate da LPS (200 ng/ml) per 24h; (c) TNF-α in cellule THP-1 esposte a LPS 1 µg/ml per 24h. Ogni colonna rappresenta la media ±SD. I dati sono stati analizzati mediante un'analisi one-way ANOVA seguita da test di confronti multipli Tukey: *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001 vs. CTRL; °p<0,05, °°p<0,01, °°°p<0,001 rispetto a LCTM o LPS.



(200 ng/mL) per 24h. Un aumento significativo dei livelli di TNF-α è stato osservato nelle cellule THP-1 stimulate con LPS rispetto alle cellule di controllo (ANOVA: $p < 0,0001$ vs. CTRL) (Figura 5c). Il trattamento con PFP non è stato efficace nel regolare i livelli di espressione del TNF-α, sia nelle cellule non stimulate che in quelle stimulate con LPS (Figura 5c). Questi dati hanno mostrato che il PFP era in grado di inibire il rilascio di citochine pro-infiammatorie specificamente nei cheratinociti.

5. Il PFP previene la compromissione delle giunzioni intercellulari dei cheratinociti indotta da un danno infiammatorio-ossidativo
Uno degli aspetti più rilevanti nella valutazione dell'integrità dell'epidermide riguarda l'analisi delle giunzioni intercellulari strette (*tight junction, TJ*). Le TJ sono costituite da complessi multiproteici transmembrana, come l'occludina, claudine e molecole di adesione che sono legate al citoscheletro da proteine *zonula occludens* (ZO), che

fungono da proteine regolatrici [18, 19]. Queste proteine interconnettono le cellule dello strato granulare, garantendo la funzione barriera nell'epidermide integro. Inoltre, la barriera cutanea è garantita da due importanti proteine come la filaggrina e la loricrina. La filaggrina aggrega i filamenti di cheratina e favorisce la condensazione del citoscheletro e la compattazione cellulare per formare l'involucro cornificato [19-21]; la loricrina è una delle proteine strutturali più importanti espresse nello strato granulare, che contribuisce alla formazione dello strato cornificato [19-21]. In questo lavoro abbiamo studiato l'espressione proteica di due TJ, occludina e ZO-1, mediante immunofluorescenza in cellule HaCaT pretrattate con PFP (100 µg/ml) per 2h e poi esposte a LPS+H₂O₂ per 3h. Le immagini di immunofluorescenza mostrano l'espressione di occludina e ZO-1 nelle cellule di controllo e trattate con PFP (Figura 6). L'esposizione a LPS+H₂O₂ per 3h ha alterato l'espressione della giunzione ZO-1

mostrando una distribuzione frammentaria lungo la membrana delle cellule HaCaT rispetto al controllo (Figura 6a). Il pretrattamento con PFP è stato in grado di prevenire il danneggiamento della membrana indotto da LPS+H₂O₂ preservando l'espressione di ZO-1 (Figura 6a). Analogamente, l'espressione di occludina è risultata gravemente ridotta nella membrana delle cellule HaCaT esposte a LPS+H₂O₂, mentre il pretrattamento con PFP è stato in grado di inibire completamente la compromissione della giunzione occludina promossa dallo stimolo infiammatorio-ossidativo (Figura 6b). Mediante Western Blot, abbiamo poi analizzato l'espressione proteica di filaggrina e loricrina nelle cellule HaCaT nella stessa condizione. È interessante notare che la stimolazione dei cheratinociti con LPS+H₂O₂ per 3h aumenta in modo significativo i livelli di proteine filaggrina e loricrina rispetto alla controparte non stimolata (ANOVA: $p < 0,0001$ vs. CTRL). L'analisi statistica ha mostrato

che PFP a 100 Qg/mL non ha influenzato i livelli di filaggrina (Figura 7a) e di loricrina (Figura 7b) rispetto alle cellule controllo, ma ha inibito l'aumento dei livelli indotti da LPS+H₂O₂ sia di filaggrina che di loricrina (*post hoc*: filaggrina $p=0,0467$, loricrin $p = 0,0203$ vs. LPS+H₂O₂) (Figura 7). Questi dati hanno rivelato che PFP è in grado di mantenere l'integrità della barriera cutanea regolando i livelli di espressione delle TJ e delle proteine filaggrina e loricrina, due componenti essenziali dell'integrità della barriera cutanea.

6. L'estratto PFP mostra proprietà non irritanti e lenitive in un modello di mucosa vaginale ricostituita in vitro

Guidati da risultati molto positivi ottenuti studiando l'effetto del PFP a livello cellulare e molecolare, abbiamo mirato a investigare il PFP in un contesto pratico di applicazione funzionale valutando il potenziale irritante e lenitivo in un modello *in vitro* di mucosa vaginale ricostruita (22-26).

La ricostruzione della mucosa vaginale è stata ottenuta mediante un multistrato di cellule di carcinoma vulvare umano (A430) cresciute sulla sommità di un supporto inerte. Per valutare il possibile effetto irritante di PFP, la vitalità cellulare è stata analizzata sul multistrato cellulare trattato per 24 h con una soluzione acquosa di sodio dodecilsolfato allo 0,5% (SDS) come controllo positivo dell'irritazione, una soluzione salina come controllo negativo e una soluzione acquosa di PFP alla concentrazione dello 0,1% e dello 0,01%. Un marcato effetto

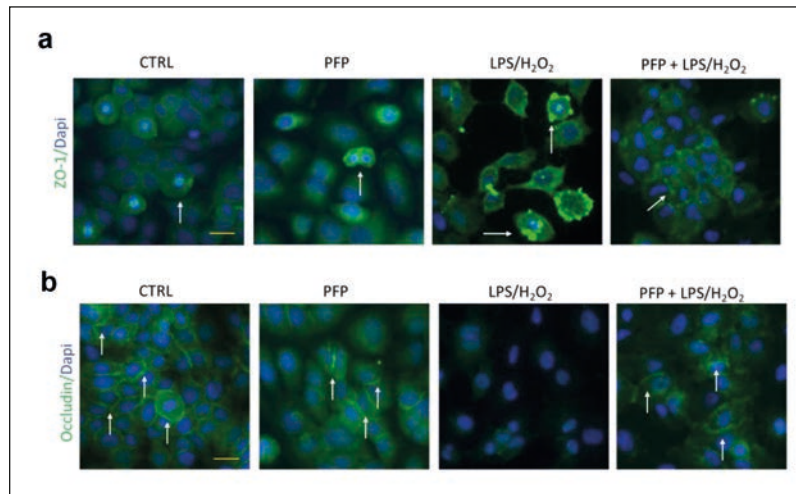


Figura 6. Analisi di immunofluorescenza delle giunzioni (a) ZO-1 (verde) e (b) occludina (verde) in cheratinociti (HaCaT) non stimolati (CTRL) o trattati con PFP (100 Qg/ml), o pretrattati con PFP per 2h ed esposti 3h a LPS+H₂O₂. Dapi (blu) indica i nuclei cellulari colorati. Scala: 100 µm.

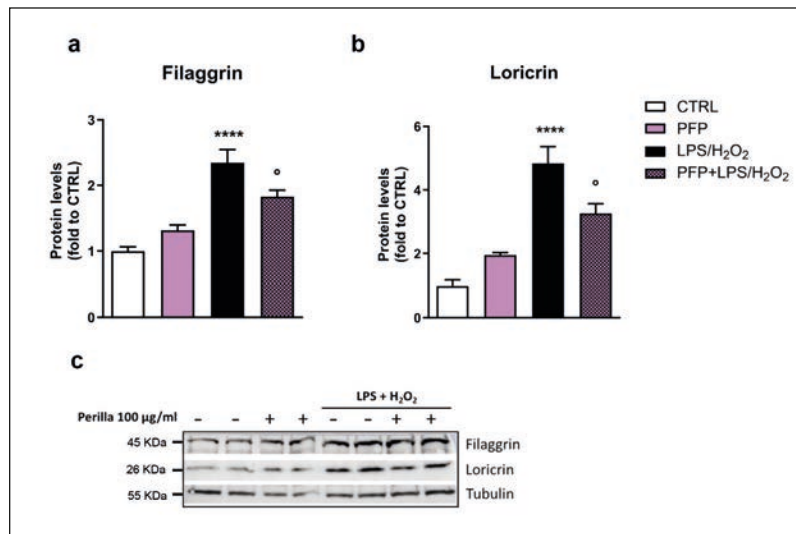


Figura 7. Analisi Western blot dei livelli proteici di (a) filaggrina e (b) loricrina in cheratinociti (HaCaT) non stimolati (CTRL), o trattati con PFP (100 µg/ml), o pretrattati con PFP per 2h ed esposti 3h a LPS+H₂O₂. (c) L'immunoblot rappresenta i livelli proteici di filaggrina e loricrina, mentre la tubulina è stata utilizzata come controllo endogeno. Ogni colonna rappresenta la media±SD. I dati sono stati analizzati mediante un'analisi one-way ANOVA seguita da test di confronti multipli Tukey: **** $p < 0,0001$ vs. CTRL; * $p < 0,05$ vs. LPS+H₂O₂.

della soluzione SDS ha provocato una compromissione della vitalità cellulare di circa il 90% rispetto al controllo fisiologico. Al contrario, la soluzione acquosa di PFP allo 0,1% e allo 0,01% non ha influenzato la vitalità cellulare della mucosa ricostituita, analogamente al campione di controllo (Figura 8a). Abbiamo analizzato inoltre la capacità lenitiva del PFP in una condizione di irritazione utilizzando il test

MTT; il modello di mucosa vaginale è stato trattato con una soluzione acquosa di acido lattico (LA) allo 0,4% per 1h, quindi esposto a PFP allo 0,1%, o soluzione di acido acetilsalicilico allo 0,03% (ASP) per 4h, come agente lenitivo di controllo. I risultati hanno mostrato che la soluzione di LA ha influenzato la vitalità cellulare di circa il 15% rispetto alla mucosa non trattata. Anche se in misura minore

- Produzione saponette vegetali 100% personalizzate per erboristerie, profumerie, farmacie
- Saponette da Hotel
- Produzione di cosmetici
- Lavorazione c/o terzi

Alchimia Soap Srl
Via Mantova, 5
21057 Olgiate Olona (VA)
Tel.: 0331631582
Fax: 0331674574
www.alchimiasoap.it
soap@alchimiasoap.it

Figura 8. Analisi delle attività (a) irritanti, (b) lenitive e (c) idratanti della soluzione PFP 0,1% in un modello 3D *in vitro* di mucosa vaginale ricostruita. Le soluzioni SDS 0,5% e acido lattico (LA) 0,4% sono state utilizzate come controlli irritanti; la soluzione di acido acetilsalicilico (ASP) allo 0,03% è stata utilizzata come agente di controllo attivo. I dati sono espressi come media \pm SD di due esperimenti indipendenti.

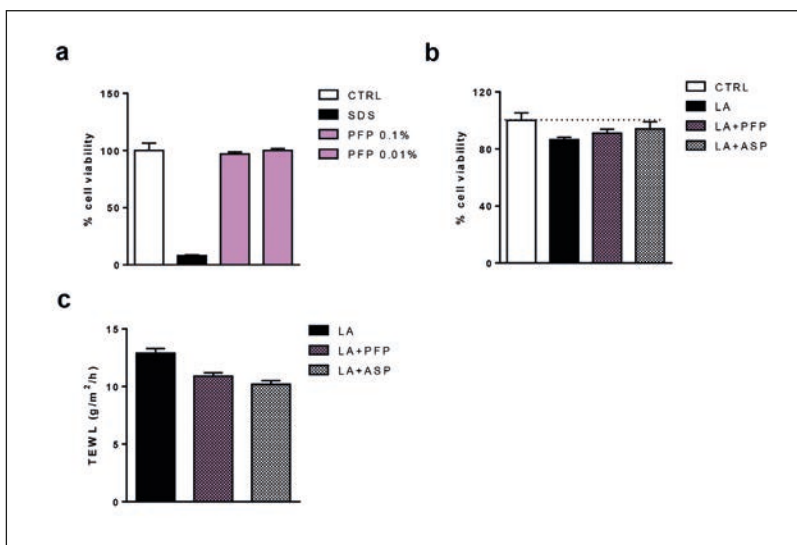
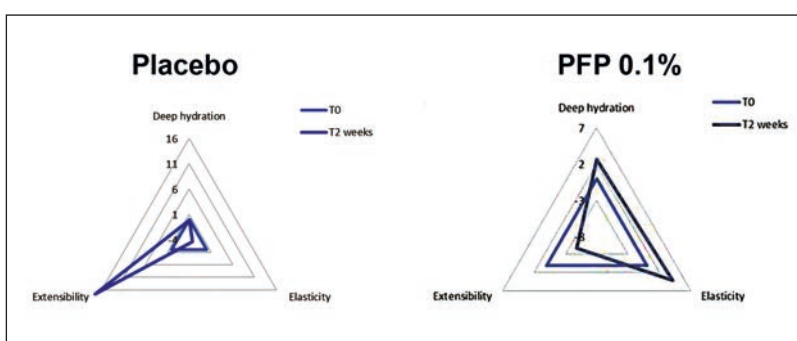


Figura 9. Analisi osservazionale dei parametri di idratazione profonda, elasticità ed estensibilità dell'area vaginale di 30 volontarie al momento dell'inizio (T0) e dopo due settimane (T2) di trattamento con crema e maschera contenente PFP 0,1% o placebo. I dati sono espressi come punteggio totale assegnato a seguito della valutazione del ginecologo.



rispetto all'anti-infiammatorio, la soluzione PFP 0,1% è stata in grado di migliorare la vitalità cellulare della mucosa vaginale rispetto al trattamento con LA (Figura 8b). Analogamente,

anche se in misura minore, la soluzione PFP allo 0,1% è stata in grado di migliorare la vitalità cellulare della mucosa vaginale rispetto al trattamento con LA (Figura 8b). Per valutare ulter-

riormente l'effetto del PFP sull'idratazione della pelle è stato utilizzato il test TEWL (*trans-epidermal water loss*) che misura la quantità di acqua condensata che si diffonde su un'area fissa dello strato corneo. La mucosa vaginale ricostituita è stata esposta all'irritante LA 0,4%, per 1h, quindi trattato con una soluzione di PFP allo 0,1% o ASP allo 0,03% per 4h. Dopo trattamento con LA, la TEWL è risultata notevolmente aumentata, mentre l'applicazione del PFP ha ridotto i valori di TEWL a un livello comparabile a quello di ASP (Figura 8c).

7. Il PFP migliora l'idratazione profonda e l'elasticità dopo l'applicazione topica *in vivo*

Alla luce delle evidenze precedenti, la terza fase dello studio ha avuto lo scopo di valutare la tollerabilità, l'efficacia e la sicurezza di due preparati topici, una maschera e una crema, contenenti il PFP 0,1% in un'applicazione *in vivo*. Per lo studio, 30 volontarie, con un'età media di 58,1 anni, sono state reclutate e divise in due gruppi (27-34).

I volontari hanno utilizzato il trattamento (attivo o placebo) consistente in crema e maschera per 2 settimane, dopo aver pulito la zona intima, nel modo seguente:

- Crema intima lenitiva: una volta al giorno applicando abbondantemente nella zona anogenitale e circostante.
- Maschera: 3 volte a settimana con un'applicazione di 20 minuti, assicurandosi di utilizzare un sistema protettivo per evitare di bagnare gli indumenti.

Durante il trattamento con la maschera, hanno anche usato la crema. Al check-up iniziale e dopo 15 giorni di trattamento sono state eseguite valutazioni cliniche e strumentali.

Alla fine del trattamento, il ginecologo ha condotto l'esame dei soggetti e ha assegnato un

	T ₀	T _{2settimane}	Variazione % T _{2weeks} -T ₀	p value T ₀ vs T _{2settimane}
ACTIVE PFP (0.1%)	33.0 \pm 4.9	35.6 \pm 4.8	+ 2.6%	p<0.01**
PLACEBO	35.4 \pm 4.6	35.3 \pm 5.2	- 0.1%	p>0.05
ATTIVO vs PLACEBO				p=0.01*

Tabella 1. Valori di punteggio ottenuti mediante un esame di idratazione profonda dei gruppi trattati con PFP o placebo. Sono riportate le medie, le deviazioni standard, le variazioni e la significatività statistica (valore p) per ciascun gruppo e tra i gruppi. *p<0,05, **p<0,01.

	T ₀	T _{2settimane}	Variazione % T _{2weeks} -T ₀	p value T ₀ vs T _{2settimane}
ACTIVE PFP (0.1%)	0.822 \pm 0.084	0.856 \pm 0.042	+ 4.1%	p=0.052
PLACEBO	0.814 \pm 0.063	0.788 \pm 0.056	- 0.1%	p>0.05
ATTIVO vs PLACEBO				p<0.05*

Tabella 2. Valori di punteggio ottenuti mediante un esame dell'elasticità dei gruppi trattati con PFP o placebo. Sono riportate le medie, le deviazioni standard, le variazioni e la significatività statistica (valore p) per ciascun gruppo e tra i gruppi. *p< 0,05.

punteggio ai parametri di arrossamento, secchezza, desquamazione, gonfiore, vesciche, e presenza di secrezioni, secondo una scala stabilita. L'analisi statistica ha riportato un aumento significativo dell'idratazione profonda nelle donne trattate con PFP rispetto alla controparte placebo. All'interno del gruppo placebo, non sono state registrate variazioni significative (Figura 9) (Tabella 1). Per quanto riguarda l'elasticità della pelle, dopo due settimane, non sono state osservate differenze significative nel valore dell'estensibilità cutanea tra le donne trattate con PFP e placebo (Figura 9). Al contrario, il trattamento con PFP ha migliorato l'elasticità totale della pelle rispetto al gruppo placebo. Non sono state misurate variazioni statisticamente significative nel gruppo placebo (Figura 9) (Tabella 2). Inoltre, è stata eseguita una valutazione clinica dell'efficacia e della compatibilità, della secchezza vaginale e dell'irritazione nelle donne in pre/post-menopausa. Il trattamento con PFP ha evidenziato una diminuzione del rossore e della secchezza nelle aree perianali ed esterne dei genitali rispetto al trattamento placebo, così come la riduzione del gonfiore dei genitali esterni. L'insieme di questi dati ci hanno permesso di valutare l'effettiva efficacia e tollerabilità del PFP *in vivo*, direttamente su un'area di applicazione come la mucosa vaginale, utilizzando formulazioni semplici come un crema e una maschera.

Conclusioni

Il fitocomplesso biotecnologico di *Perilla frutescens* (L.) Britton prodotto mediante la tecnologia delle colture cellulari vegetali *in vitro*, arricchito in polifenoli, e in particolare acido rosmarinico, ha dimostrato essere un ingrediente innovativo con un alto profilo di sicurezza ed efficacia grazie al suo processo di pro-

duzione standardizzato, sostenibile e pulito. Lo studio *in vitro* in un modello di cheratinociti umani ha dimostrato le attività antinfiammatoria e protettiva di perilla sulla barriera cutanea. L'innovativo fitocomplesso ha anche evidenziato attività idrattanti e lenitive in un modello 3D di mucosa vaginale ricostruita, oltre al miglioramento dell'integrità della mucosa, aumentando l'idratazione profonda e l'elasticità totale nei test clinici. Nel complesso, i nostri risultati evidenziano che il fitocomplesso di perilla potrebbe essere un ingrediente eccellente in ambito cosmetico, nelle preparazioni per uso topico, come nella cura e igiene intima, dove ha mostrato una buona attività nel preserva-

re l'integrità della mucosa vaginale, specialmente in condizioni vulnerabili come la menopausa. Inoltre, *P. frutescens* potrebbe avere una potenziale applicazione come un agente topico nei disturbi dermatologici che coinvolgono una condizione infiammatoria e compromettono l'integrità della pelle.

***UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MODENA,**
Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Modena, Italia

****AETHERA BIOTECH, Camisano**
Vicentino, Italia

*****UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SIENA,**
Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia, Siena, Italia

******UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE,**
Dipartimento di Neuroscienze, Psico-

TECNO-LIO
L'energia della Vita

LAVORAZIONI C/TERZI
Integratori alimentari
in capsule, liquidi e liofilizzati

Si eseguono produzioni di piccoli e medi lotti

- Integratori in capsule formato 0 in barattolo o in blister
 - Integratori liquidi in monodose da 10 e 15 ml
 - Integratori con contagocce
 - Liquidi e soluzioni in flaconi fino a 1000 ml
- Liofilizzazione in monodose con sigillatura sottovuoto
 - Integratori di nostra produzione con possibilità di personalizzazione
 - Lavorazione materie prime fornite dal cliente
 - Confezionamento finale
 - Assistenza per formulazioni personalizzate

Tecno-lio S.r.l.
Via Riviera Berica, 260 - 36100 Vicenza
Tel. 0444530465 - fax. 0444532275
E-mail: info@tecno-lio.it
Website: www.tecno-lio.it

Il fito-complesso biotecnologico di *Perilla frutescens* (L.) Britton prodotto mediante la tecnologia delle colture cellulari vegetali in vitro, arricchito in polifenoli, e in particolare acido rosmarinico, ha dimostrato essere un ingrediente innovativo con un alto profilo di sicurezza ed efficacia grazie al suo processo di produzione.



Foto di Suampa

logia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA), Firenze, Italia

***** **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SIENA, Dipartimento di Scienze fisiche, della Terra e dell'Ambiente, Siena, Italia**
***** **EUROCHEM RICERCHE S.R.L., Mestrino, Italia**

Pressi G, Rigillo G, Governa P, Borgonetti V, Baini G, Rizzi R, Guarnerio C, Bertaiola O, Frigo M, Merlin M, Paltrinieri S, Zambonin R, Pandolfo S, Biagi M. A Novel *Perilla frutescens* (L.) Britton Cell-Derived Phytocomplex Regulates Keratinocytes Inflammatory Cascade and Barrier Function and Preserves Vaginal Mucosal Integrity In Vivo. *Pharmaceutics*. 2023 Jan 10;15(1):240. doi: 10.3390/pharmaceutics15010240. PMID: 36678869; PMCID: PMC9861994.

Bibliografia

- 1 - Takano, H.; Osakabe, N.; Sanbongi, C.; Yanagisawa, R.; Inoue, K.I.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Baba, S.; Ichiishi, E.I.; Yoshikawa, T. Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Exp. Biol. Med.* **2004**, 229, 247-254.
- 2 - Ken-Ichi, K.; Jun, T.; Takahiro, M.; Kentaro, K.; Takashi, S.; Yoshihiro, M.; Kaori, U.; Wakame, K. *Perilla* leaf extract prevents atopic dermatitis induced by an extract of *Dermatophagoides farinae* in NC/Nga mice. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **2016**, 34, 272-277.
- 3 - Bae, J.S.; Han, M.; Shin, H.S.; Kim, M.K.; Shin, C.Y.; Lee, D.H.; Chung, J.H. *Perilla frutescens* leaves extract ameliorates ultraviolet radiation-induced extracellular matrix damage in human dermal fibroblasts and hairless mice skin. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, 195, 334-342.
- 4 - Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Yoshikawa, T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: Anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis* **2004**, 25, 549-557.
- 5 - Kangwan, N.; Pintha, K.; Lekawanvijit, S.; Suttajit, M. Rosmarinic Acid Enriched Fraction from *Perilla frutescens* Leaves Strongly Protects Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats. *Biomed Res. Int.* **2019**, 1-13.
- 6 - Yang, L.; Zeng, Y.; Wang, J.; Zhang, Y.; Hou, Y.; Qin, Q.; Ma, W.; Wang, N. Discovery and analysis the anti-pseudo-allergic components from *Perilla frutescens* leaves by overexpressed MRGPRX2 cell membrane chromatography coupled with HPLC-ESI/TOF system. *J. Pharm. Pharmacol.* **2020**, 72, 852-862.
- 7 - Yan, Y.; Yi, H.; Zhang, D.; Li, C.; Chen, L.M.; Zhao, J.Y.; Gao, H.M.; Yan, L.H.; Liu, X.Q.; Wang, Z.M. Quality standard of *Perillae Folium* based on multicomponent determination with HPLC method. *Chin. J. Tradit. Chin. Med.* **2021**, 46, 4051-4060.
- 8 - Biagi, M.; Pecorari, R.; Appendino, G.; Miraldi, E.; Magnano, A.R.; Governa, P.; Cettolin, G.; Giachetti, D. *Herbal products in Italy: The thin line between Phytotherapy, nutrition and Parapharmaceuticals; A normative overview of the fastest growing market in Europe.* *Pharmaceutics* **2016**, 9, 65.
- 9 - Vertuani, S.; Beghelli, E.; Scalambra, E.; Malisardi, G.; Copetti, S.; Toso, R.D.; Baldisserotto, A.; Manfredini, S. *Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations.* *Molecules* **2011**, 16, 7068-7080.
- 10 - Doran, P.M. *Therapeutically important proteins from in vitro plant tissue culture Activity.* *Cosmet* **2022**, 9, 12.
- 11 - Zerbinati, N.; Serati, M.; Origoni, M.; Candiani, M.; Iannitti, T.; Salvatore, S.; Marotta, F.; Calligaro, A. *Microscopic and ultrastructural modifications of postmenopausal atrophic vaginal mucosa after fractional carbon dioxide laser treatment.* *Lasers Med. Sci.* **2015**, 30, 429-436.
- 12 - Mac Bride, M.B.; Rhodes, D.J.; Shuster, L.T. *Vulvovaginal atrophy.* *Mayo Clin. Proc.* **2010**, 85, 87-94.
- 13 - Brincat, M.; Moniz, C.J.; Studd, J.W.W.; Darby, A.; Magos, A.; Emburey, G.; Versi, E. *Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness.* *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **1985**, 92, 256-259.
- 14 - Nybom, H.; Weising, K.; Rotter, B. *DNA fingerprinting in botany: Past, present, future.* *Investig. Genet.* **2014**, 5, 1.
- 15 - Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.* *Exp. Cell Res.* **1968**, 50, 151-158.
- 16 - Pressi, G.; Bertaiola, O.; Guzzo, F.; Biagi, M. *Phytocomplex and extract of a meristematic cell line selected of Perilla frutescens.* Patent ITA102020000028230/PCT/IB2021/057560, 24 November 2020.
- 17 - Rousselle, P.; Montmasson, M.; Garnier, C. *Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization.* *Matrix Biol.* **2019**, 75-76, 12-26.
- 18 - Langbein, L.; Grund, C.; Kuhn, C.; Praetzel, S.; Kartenbeck, J.; Brandner, J.M.;

- Moll, I.; Franke, W.W. *Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom*. Eur. J. Cell Biol. **2002**, 81, 419-435.
- 19 - Blaskewicz, C.D.; Pudney, J.; Anderson, D.J. *Structure and Function of Intercellular Junctions in Human Cervical and Vaginal Mucosal Epithelia*. Biol. Reprod. **2011**, 85, 97.
- 20 - Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G. *The cornified envelope: A model of cell death in the skin*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2005**, 6, 328-340.
- 21 - Kim, B.E.; Howell, M.D.; Guttman, E.; Gilleaudeau, P.M.; Cardinale, I.R.; Boguniewicz, M.; Krueger, J.G.; Leung, D.Y.M. *TNF- α Downregulates Filaggrin and Loricrin through c-Jun N-terminal Kinase: Role for TNF- α Antagonists to Improve Skin Barrier*. J. Invest. Dermatol. **2011**, 131, 1272.
- 22 - Section 4 Health Effects OECD/OCDE 431 OECD Guideline for Testing of Chemicals In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method. OECD iLibrary, 2019.
- 23 - Assessment, ECVAM. *Statement on the Scientific Validity of In-Vitro Tests for Skin Irritation Testing*. 2009.
- 24 - Kandárová, H.; Liebsch, M.; Schmidt, E.; Genschow, E.; Traue, D.; Spielmann, H.; Meyer, K.; Steinhoff, C.; Tornier, C.; De Wever, B.; et al. *Assessment of the Skin Irritation Potential of Chemicals by Using the SkinEthic Reconstructed Human Epidermal Model and the Common Skin Irritation Protocol Evaluated in the ECVAM Skin Irritation Validation Study*. Sage **2006**, 34, 393-406.
- 25 - Tornier, C.; Rosdy, M.; Maibach, H.I. *In vitro skin irritation testing on reconstituted human epidermis: Reproducibility for 50 chemicals tested with two protocols*. Toxicol. In Vitro **2006**, 20, 401-416.
- 26 - Test Guideline OECD/OCDE 439: *In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods*. OECD iLibrary, 2021.
- 27 - Guaschino, S.; Benvenuti, C.; Agnello, A.; Agnolotti, M.; Agostinelli, D.; Agrifoglio, V.; Albani, F.; Alesi, L.; Amadori, A.; Andresini, R.; et al. *Progetto SOPHY: Studio osservazionale su pH vaginale, stile di vita e corretta igiene intima nella donna nelle diverse eta e condizioni fisiopatologiche. Parte II*. Minerva Ginecol. **2008**, 60, 353-362.
- 28 - Basketter, D.; Baverel, M.; Diembeck, W. *Cosmetics Europe: Product test guidelines for the assessment of human skin compatibility*. In COLIPA Symposium on Alternatives to Animal Testing; John Hopkins University: Baltimore, MD, USA, 1997.
- 29 - European Cosmetics Association. *Cosmetics Europe: Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetics Products*. Brussels Rev. Effic. Eval. Guidelines. 2008.
- 30 - Bernauer, U.; Bodin, L.; Chaudhry, Q.; Coenraads, P.J.; Dusinska, M.; Ezen-dam, J.; Gaffet, E.; Galli, C.L.; Granum, B.; Panteri, E. et al. *The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their safety evaluation (SCCS/1628/21)*. Regul. Toxicol. Pharmacol. **2021**, 127, 105052.
- 31 - Piérard, G.E.; Piérard, G.E. *EEMCO Guidance to the in vivo Assessment of Tensile Functional Properties of the Skin Part 1: Relevance to the Structures and Ageing of the Skin and Subcutaneous Tissues*. EEMCO Rev. Ski. Pharmacol. Appl. Ski. Physiol **1999**, 12, 352-362.
- 32 - Rodrigues, L. *EEMCO guidance to the in vivo assessment of tensile functional properties of the skin. Part 2: Instrumentation and test modes*. Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. **2001**, 14, 52-67.
- 33 - Berardesca, E.; Loden, M.; Serup, J.; Masson, P.; Rodrigues, L.M. *The revised EEMCO guidance for the in vivo measurement of water in the skin*. Ski. Res. Technol. **2018**, 24, 351-358.
- 34 - Serup, J.; Jemec, G.B.E.; Grove, G.L. *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006; p. 1029.

Sitarama®

Via Michelucci, 9
50028 Barberino Tavarnelle (FI)

presenta **Henné Color:**

una gamma completa di colorazioni naturali a base di henné, pianta tintoria conosciuta per le sue proprietà benefiche e coloranti. Senza ossidanti, ammoniaca, acqua ossigenata: composta da 6 linee di prodotti:

- **Polvere Henné Color**
riflessanti naturali, di erbe tintorie, disponibile in 7 colorazioni
- **Polvere naturale NON colorante fortificante**
Neutro
- **Crema Colorante Henné Nuance**
colorazione dolce pronta all'uso, per uso frequente, disponibile in 12 colorazioni
- **Hair Mascara** per un ritocco rapido del colore; disponibile in 7 colorazioni
- **Shampo Henné mantenimento del colore**
disponibile in 7 colorazioni oltre al neutro
- **Balsamo Henné Ristrutturante**
doppio utilizzo: aggiunto nella preparazione fissa il colore e dopo la tinta rimuove le particelle dalla radice dei capelli lasciandoli morbidi e lucenti.



www.sitarama.com

