

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE FARMACEUTICHE APPLICATE

TESI DI LAUREA

*Approccio ecosostenibile al design di prodotti solari tramite
l'utilizzo di un estratto di Pongamia*

RELATORE: Chiar.mo Prof. ressa Zancato Mirella
CO-RELATORI: Dott. Mattia Battistin

LAUREANDO: Giorgio Bianchin
Matricola: 2019335

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

1	INTRODUZIONE	4
1.1	Struttura della pelle	4
1.2	Effetti delle Radiazioni UV	8
1.3	Sun Protection Factor	8
1.3.1	Metodi in vivo per il calcolo dell' SPF	9
1.3.2	Metodi in vitro per il calcolo dell' SPF	12
1.3.3	I Filtri UV	13
1.3.4	I Filtri Chimici	15
1.3.5	I Filtri Fisici	17
1.4	Possibili impatti dei filtri solari nella barriera corallina	21
1.5	<i>Pongamia Pinnata</i> L.	25
2	SCOPO DELLA TESI	28
3	PARTE SPERIMENTALE	28
3.1	Strumenti e reagenti	28
3.2	Metodi	29
3.2.1	Preparazione dell' emulsione	29
3.2.2	Analisi Chimico-Fisiche sul prodotto finito	33
3.2.3	Calcolo SPF in vitro con metodo Diffey-Robson	36
3.2.4	Analisi DPPH	37
3.3	Risultati e discussione	40
3.3.1	Analisi Chimico-Fisiche	40
3.3.2	SPF in Vitro	42
3.3.3	Analisi DPPH	51
4	Conclusioni	55
5	Bibliografia	57

1 INTRODUZIONE

A partire dalla metà dello scorso secolo, il mondo della cosmesi ha dovuto fare i conti con il desiderio dei consumatori di acquistare prodotti sempre più “green” e ciò ha spinto numerosissime aziende a sviluppare nuovi cosmetici che contenessero sostanze derivanti dal mondo vegetale. Dagli anni '60 sono stati fatti passi da gigante per quanto riguarda lo sviluppo di idratanti e detergenti ecosostenibili; tuttavia, la categoria dei solari è rimasta indietro a causa dell'impossibilità di ottenere dei filtri solari di origine vegetale. In questo lavoro ci proponiamo di sviluppare diversi tipi di creme solari con un ridotto contenuto di molecole di sintesi. Ciò è reso possibile grazie all'azione del booster *Pongamolo*, una molecola derivante dall'olio dei semi di *Pongamia pinnata* L., il quale sembra aumentare il fattore di protezione solare (SPF) dei prodotti.

1.1 Struttura della pelle

La pelle è il più grande organo del corpo umano, raggiungendo una superficie di 1.5-2 m² e va a costituire all'incirca il 16% del peso di una persona (Sakamoto K 2017). Principalmente serve per proteggere l'organismo da insulti di varia natura; tuttavia, è anche coinvolta nella regolazione di scambi d'acqua con l'ambiente esterno, nella termoregolazione, nella sintesi di alcune sostanze (come la vitamina D (D'Orazio J 2013)), nell'assorbimento ed escrezione di farmaci e di sostanze tossiche. Inoltre, è un fattore determinante la bellezza fisica di ogni persona, influenzando la qualità della vita e la riproduzione della specie umana. Essa è composta da epidermide, derma, ipoderma ed annessi cutanei (con i quali si intende unghie, capelli, ghiandole sudoripare e mammarie).

L'epidermide è lo strato più esterno della pelle, a diretto contatto con l'ambiente esterno, ed il più sottile con uno spessore di 0.1-0.2mm. Esso è formato principalmente da cheratinociti, i quali compongono il 95% delle cellule totali e vanno a formare diversi strati a seconda del loro stadio vitale, andando a dividere l'epidermide in cinque livelli. Queste cellule, infatti, intraprendono un processo di differenziamento, chiamato cheratinizzazione, andando a perdere la propria capacità riproduttiva e riempiendosi di cheratina una volta morte (D'Orazio J 2013). Il 5% restante è formato da melanociti, cellule di Langerhans e cellule di Merkel. Lo strato basale, anche chiamato strato germinativo, è il più profondo dell'epidermide, a diretto contatto con la giunzione dermo-epidermica, da cui i cheratinociti assorbono i nutrienti. È l'unico luogo in cui ci sono cellule staminali in continua riproduzione, le cui cellule figlie intraprendono un percorso di specializzazione che le porterà a formare gli strati successivi dell'epidermide o a diventare nuove cellule madri. È un processo

dinamico, in cui le cellule aumentano o diminuiscono la velocità di riproduzione in base all'integrità e allo spessore degli strati sovrastanti (Sakamoto K 2017). Qui risiedono anche i melanociti, cellule dendritiche che producono melanina, un pigmento derivato dalla tirosina e responsabile dell'abbronzatura (D'Orazio J 2013). Ogni melanocita produce una quantità tale di melatonina da rifornire tra i 30 e i 40 melanociti. Questa si trova all'interno di vescicole chiamate "melanosomi", i quali si vanno a disporre attorno al nucleo della cellula per proteggerlo dalle radiazioni UV. Lo strato spinoso si trova immediatamente sopra il precedente ed è formato da cheratinociti vitali. Questi iniziano i processi di risalita verso l'esterno e di fissazione mediante la creazione di desmosomi, i quali conferiscono alle cellule un aspetto spinoso. Qui inizia anche la produzione di cheratina e filaggrina (una proteina che raggruppa la cheratina in fasci), le quali compongono tra l'80% e il 90% dell'epidermide e sono responsabili dell'appiattimento dei cheratinociti negli strati sovrastanti (Marks J G JR 2019). Il livello successivo è costituito dallo strato granuloso, in cui i cheratinociti continuano i processi di appiattimento, accumulo di cheratina e morte programmata. All'interno delle cellule si vedono dei granuli, chiamati appunto "granuli lamellari" e granuli di keratoialina (Marks J G JR 2019). I primi contengono lipidi, polisaccaridi e glicoproteine che vengono riversati all'esterno e che cementano tra loro le cellule dello strato corneo. I secondi invece sono formati da agglomerati di keratoialina, costituiti da diverse proteine come cheratina, pro-filaggrina fosforilata, una macroproteina costituita da 10-12 unità di filaggrina e precursore di quest'ultima, e involucrina, la quale va a disporsi sul lato citoplasmatico della membrana cellulare, contribuendo all'impermeabilizzazione delle cellule (L, et al. 1993, Sakamoto K 2017, Sakamoto K 2017). A diretto contatto con l'esterno c'è lo strato corneo, composto da 15-25 strati di cellule che prendono il nome di corneociti. Qui le cellule diventano piatte, senza più nucleo né organelli e vengono riempite di filamenti di cheratina. Inoltre, sono immerse in una matrice lipidica (ciò che granuli lamellari riversano all'esterno), che le ancora tra di loro. I corneociti sono responsabili della plasticità ed elasticità dello strato corneo (anche se la quantità d'acqua presente gioca un ruolo fondamentale), mentre la matrice lipidica, formata soprattutto da ceramidi, colesterolo e acidi grassi liberi, è responsabile della funzione protettiva. A partire dallo strato basale, una cellula impiega circa 30 giorni per risalire fino alla parte più esterna dello strato corneo, per poi desquamare ed essere lavata via (Sakamoto K 2017, Marks J G JR 2019).

Al di sotto dell'epidermide si trova la giunzione dermo-epidermica, una membrana costituita principalmente da collagene, proteoglicani e glicoproteine, che ha il compito di ancorare l'epidermide al derma e di permettere gli scambi intercellulari. Proseguendo verso l'interno troviamo il derma, composto prevalentemente da collagene, fibre elastiche e sostanza fondamentale, prodotte da cellule

chiamate fibroblasti (Marks J G JR 2019, Sakamoto K 2017). Anch'esso può essere diviso in due strati: strato papillare e strato reticolare. Il primo è più superficiale ed è costituito da sostanza fondamentale, collagene e da una rete di capillari e nervi. La sua funzione è quella di nutrire l'epidermide e gli annessi cutanei e, per questo motivo, presenta una serie di estroflessioni, chiamate papille dermiche, che si interdigitano con l'epidermide e servono per aumentare la superficie di contatto. Lo strato reticolare si trova al di sotto del primo, è più ricco di matrice extra-cellulare ed è meno popolato rispetto allo strato precedente. Anch'esso serve a sostenere (in maniera più fisica) gli strati sovrastanti, grazie alla presenza di numerose fibre di collagene che si dispongono parallelamente all'epidermide. Queste vanno a circondare vasi sanguigni, nervi, follicoli piliferi, ghiandole sudoripare (Marks J G JR 2019, Sakamoto K 2017). Le cellule del derma richiedono molto tempo per rinnovarsi, da mesi ad anni, e con l'età diminuisce la velocità di sintesi dei componenti del derma mentre la velocità con cui collagene, fibre elastiche e sostanza fondamentale si degradano restano invariate. Ciò causa l'invecchiamento intrinseco della pelle che perde spessore, elasticità e, più in generale, bellezza con l'aumentare dell'età. Stress, esposizione solare, fumo e tanti altri fattori esterni contribuiscono all'accelerazione dei processi di invecchiamento (Fisher G J 2002, Pilkington S M 2021).

Infine, lo strato più interno è costituito dall'ipoderma e occupa lo spazio compreso tra lo strato reticolare e i muscoli. Viene chiamato anche "tessuto adiposo sottocutaneo" perché è costituito principalmente da adipociti, i quali sono raggruppati in lobi e separati tra loro da tessuto connettivo. Presenta numerose funzioni: plastica, trofica, secretrice, termica e meccanica. (Lai-Cheong J E 2021, Sakamoto K 2017)

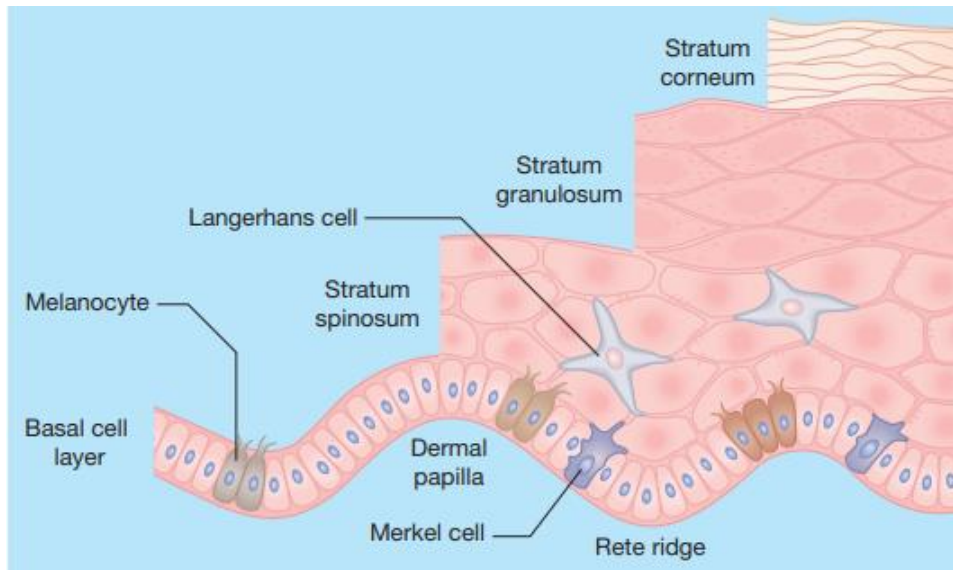


Figura 1-1: struttura dello strato corneo

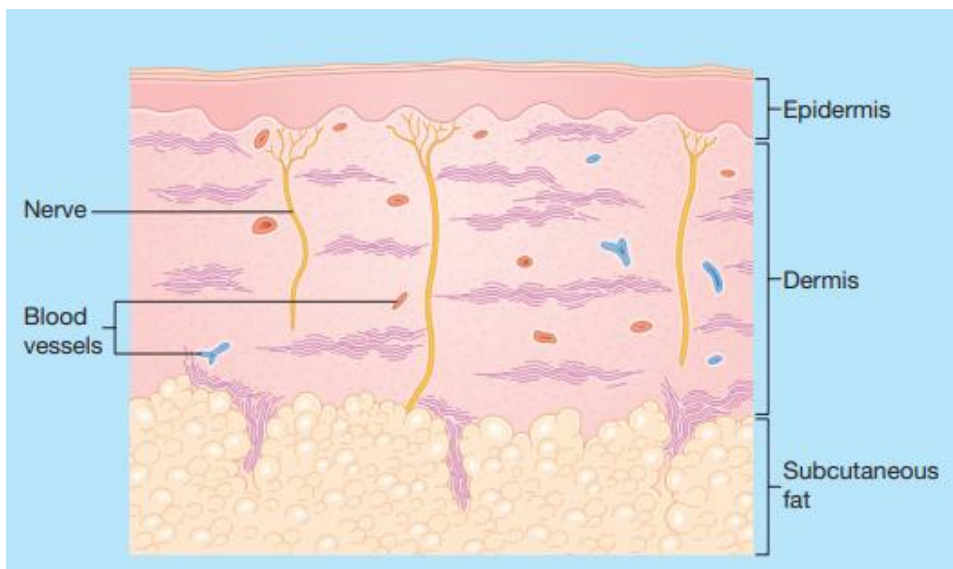


Figura 1-2: struttura della cute

1.2 Effetti delle Radiazioni UV

Avere ben chiara la struttura della cute serve per capire come la luce solare vada ad agire su di essa: porta numerosi benefici al corpo umano (come la sintesi di vitamina D), tuttavia è anche responsabile di danni che vanno dall'eritema allo sviluppo di diversi tipi di melanoma (Marks J G JR 2019, Armstrong B K 2001). A dir la verità, è giusto ricordare che non tutte le radiazioni provenienti dal Sole sono dannose per l'uomo e che lo strato di ozono che circonda la Terra blocca il 90% delle radiazioni totali (D'Orazio J 2013). Di ciò che arriva a noi, soltanto le lunghezze d'onda che rientrano nell'UV possono causare dei danni. Per capire meglio quanto queste possano essere pericolose, la IARC (International Agency for Research on Cancer) ha inserito i raggi UV nella categoria 1 e ciò significa che ci sono prove sufficienti per considerarli come cancerogeni (D'Orazio J 2013, Zhong Q-Y 2021). Dello spettro UV a noi interessano soprattutto gli UVA (con lunghezza d'onda compresa tra i 315nm e 400nm) e gli UVB (280-315nm) in quanto mediano i danni alla pelle. L'UVA ha lunghezza d'onda maggiore, minore energia e penetra più in profondità la cute arrivando fino allo strato basale dell'epidermide. È responsabile di tutti i danni cronici: dal foto-invecchiamento allo sviluppo di tumori. L'UVB invece è meno penetrante (arriva fino ai primi strati dell'epidermide) ma è responsabile dei danni acuti, come gli eritemi (D'Orazio J 2013). Sia UVA che UVB possono andare ad interagire con il DNA causando delle mutazioni. In particolare, i primi agiscono principalmente andando a produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS) le quali vanno ad attaccare numerose strutture della cellula, compreso il DNA e causando in maniera indiretta delle mutazioni (Zhong Q-Y 2021). L'UVB invece è direttamente assorbito dal DNA e causa dei riarrangiamenti molecolari che possono portare a mutazioni e cancro (Armstrong B K 2001, D'Orazio J 2013).

1.3 Sun Protection Factor

Quando si parla di solari, spesso si pensa soltanto alla crema solare, in quanto queste emulsioni sono le più vendute in assoluto, occupando più del 40% del mercato dei solari. Tuttavia, esistono anche altre forme di solari, le quali comprendono spray (sono i prodotti più venduti dopo le creme, soprattutto per proteggere i bambini, anche se spesso non viene applicata una quantità sufficiente di prodotto), gel (anche se vengono allontanati facilmente se lavati con acqua) e sticks (in modo da proteggere solo piccole aree come le labbra) (Sambandan D R 2011).

Per capire se i prodotti descritti sopra sono efficaci o meno sono stati sviluppati diversi indici che valutano la protezione contro le radiazioni solari. I più comuni sono:

- Sun Protection Factor (SPF): indica la quantità di UV che viene assorbita dal prodotto ed è calcolato in molti modi diversi che verranno approfonditi successivamente. È lo strumento più comune per capire quanto un solare sia efficace anche se è principalmente legato alla protezione contro gli UVB. Non descrive in maniera efficace la protezione di un prodotto dagli UVA;
- UVA Protection Factor (UVA-PF): rappresenta la protezione contro gli UVA e, qui in Europa, deve essere uguale ad almeno un terzo del SPF. Viene determinato di solito in vivo mediante il saggio del PPD (Persistent Pigment Darkening) anche se ultimamente si spinge sempre di più per l'utilizzo di metodi in vitro. In Europa si calcola partendo da un valore iniziale che viene calcolato in proporzione all'assorbanza riscontrata in seguito all'irradiazione per l'SPF. Da ciò si ricava un fattore di correzione (C) ed i campioni vengono poi esposti a una singola dose di UV di *1.2 volte del valore calcolato precedentemente per l'UVA-PF. Il valore finale di UVA-PF viene determinato a partire di dati rilevati dallo spettro di assorbimento dei campioni irradiati e corretto tenendo conto di C (Matts P J 2010, Sakamoto K 2017);
- Boots star rating system: questo metodo serve per valutare l'assorbimento di UVA e viene utilizzato principalmente nel Regno Unito. In questo metodo si ottiene una prima curva di assorbanza dei campioni e, in seguito, si irradia di nuovo con una potenza di 17.5 J/cm², ottenendo una seconda curva di assorbimento. Da queste si calcola l'assorbanza nell'UVA e nell'UVB e, in base ai risultati ottenuti, si riportano tra le tre e le cinque stelle sulla confezione del prodotto (S. J. Wang S Q 2008, dermatest s.d.);
- Lunghezza d'onda critica: questo indice si ottiene in seguito all'ottenimento della curva di assorbanza di un prodotto e indica la lunghezza d'onda dalla quale l'area al di sotto dell'integrale dello spettro di assorbimento rappresenta il 90% del totale nel range che va dai 290nm ai 400nm (Padera F 2013-2014).

1.3.1 Metodi in vivo per il calcolo dell'SPF

Il denominatore comune per quanto riguarda la determinazione in vivo dell'SPF consiste nell'irradiare alcuni punti della schiena con la minima quantità necessaria di luce per avere un eritema (MED) e comparare la MED senza protezione solare con quella con il solare applicato. Poiché esistono diversi modi per ottenere una misura dell'SPF in vivo, nel 2010 l'European Standardization Organization (CEN) ha pubblicato lo "Standard EN ISO 24444:2010 Cosmetics", anche chiamato "Sun protection test methods". Ciò ha permesso di uniformare le condizioni e le procedure per la determinazione dell'SPF anche se è necessario ricordare che ci sono paesi, come gli Stati Uniti, che

non hanno adottato questo protocollo. Questa procedura può essere applicata soltanto alle persone che rientrano nelle prime tre classi della scala di Fitzpatrick, la quale classifica la colorazione della pelle e la sensibilità all'abbronzatura e alla scottatura di ognuno, come riportato in tabella n. 1.3-2. Ogni soggetto può essere accettato o respinto in base alla colorazione della pelle in quanto le persone che rientrano nelle prime tre classi sono le più sensibili alla luce e permettono di vedere facilmente la presenza o meno di eritema. Detto ciò, per la generazione della luce si usa una lampada Xenon, in quanto presenta uno spettro continuo, stabile e uniforme tra i 290nm e i 400nm e con essa si irradiano dai 10 ai 20 volontari con intensità crescente. Le misurazioni vengono svolte nella parte superiore della schiena, delimitando un rettangolo di 5x6 cm, per un'area complessiva di 30-60 cm². Le radiazioni vengono applicate all'interno di 6 cerchi del diametro di 1cm, crescendo geometricamente con fattore 1.25. Nello stesso giorno si procede all'irradiazione sia della parte non protetta da solare sia di quella protetta. Nella parte di schiena che non è stata ancora irradiata si procede all'applicazione di 2 mg/cm² del prototipo. Dopo 15-30 minuti il prodotto si è asciugato e si procede ad una nuova somministrazione di raggi UV. Dopo 16-24 ore i soggetti vengono richiamati per esaminare le loro schiene ed esaminare la MED di ogni singola persona, la quale viene identificata come la prima zona che presenta rossore e bordi ben definiti. Il risultato dell'SPF si ottiene facendo il rapporto tra la MED tra la zona protetta e la MED della zona non protetta secondo la formula in figura 1.3-1 (L. H. Wang S Q 2016, Sakamoto K 2017, dermatest s.d., Bendova H 2007, Lim H W 2009).

Equazione 1: formula del calcolo dell'SPF

$$\text{SPF} = \frac{\text{MEDp (protected skin)}}{\text{MEDu (unprotected skin)}}$$

Skin Type	Typical Features	Tanning Ability
I	Pale white skin, blue/green eyes, blond/red hair	Always burns, does not tan
II	Fair skin, blue eyes	Burns easily, tans poorly
III	Darker white skin	Tans after initial burn
IV	Light brown skin	Burns minimally, tans easily
V	Brown skin	Rarely burns, tans darkly easily
VI	Dark brown or black skin	Never burns, always tans darkly

Figura 1-3: classificazione dei tipi di pelle secondo la scala proposta da Fitzpatrick

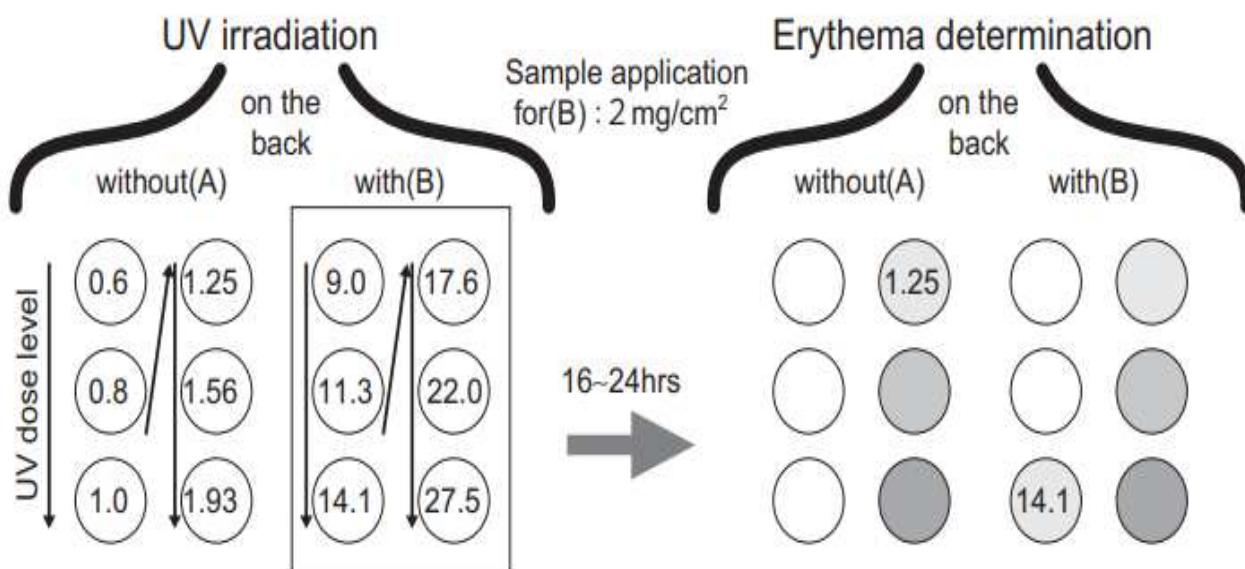


Figura 1-4: rappresentazione grafica del processo di determinazione dell'SPF in vivo

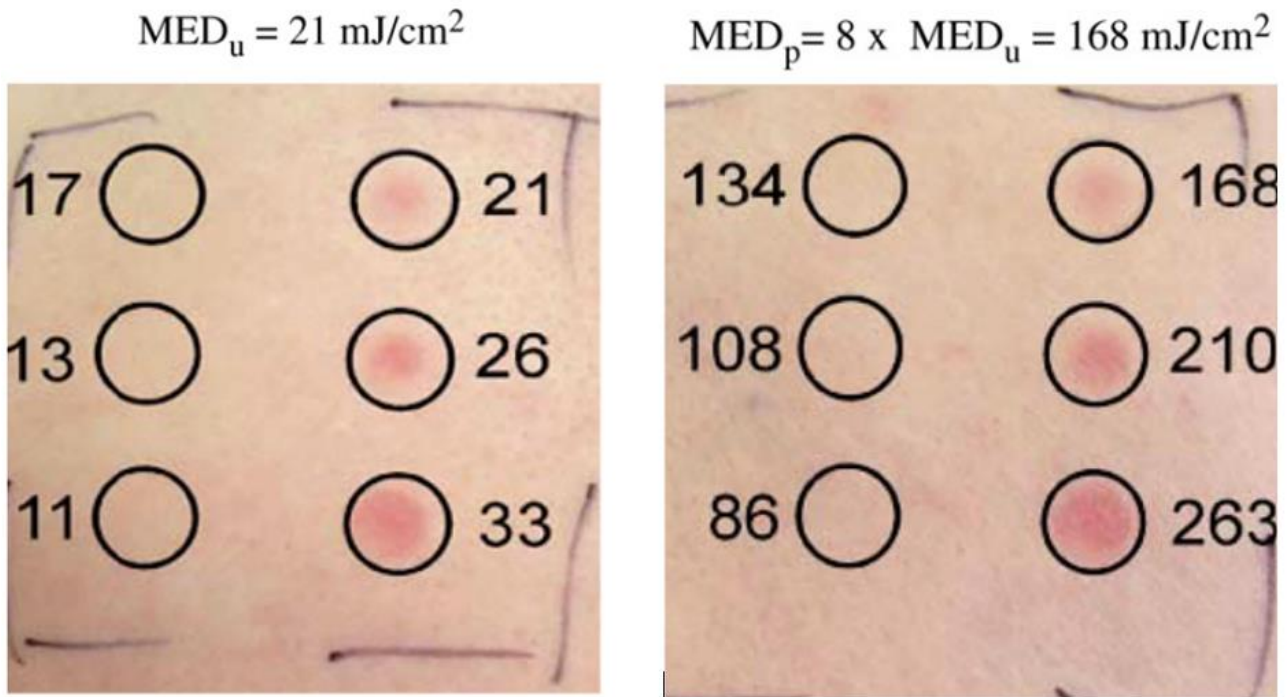


Figura 1-5: esempi di reazioni in seguito ai test di un prodotto con SPF=8. A sinistra la schiena del soggetto, senza protezione solare, è stata irradiata con un'intensità da 11 a 33mJ/cm² e la MED risulta essere 21mJ/cm². A destra è stato applicato un prodotto con SPF=8 e le radiazioni applicate andavano dai 86 ai 236mJ/cm². In questo caso la MED corrisponde a 168mJ/cm².

1.3.2 Metodi in vitro per il calcolo dell'SPF

I test per il calcolo dell'SPF in vitro si basano sullo stesso concetto del calcolo in vivo, ma sostituiscono la pelle umana con del materiale sintetico che risulti essere simile a quest'ultima. Questi stanno assumendo sempre più importanza ultimamente perché non pongono problemi per quanto riguarda l'eticità degli esperimenti. La procedura venne descritta per la prima volta da B. L. Diffey e J. Robson nel 1989 e da allora la struttura base è sempre rimasta la stessa. Essa consiste nell'applicare il solare su di un cerotto chirurgico (in particolare, venne usato del Transpore TM tape (3M Company, St. Paul, MN)) il quale presenta una superficie adesiva liscia ed una non adesiva rugosa che fa da surrogato della pelle umana. Vengono poi applicati 1.5-2 $\mu\text{L/cm}^2$ mediante la distribuzione di piccoli "puntini" di solare i quali verranno poi spalmati omogeneamente su di una superficie di 4x4cm², per una media di 30 μL circa. Fatto ciò, si analizza l'assorbanza del campione con uno spettrofotometro dotato di lampada allo Xenon, in quanto questa ha uno spettro di emissione omogeneo e continuo tra i 290nm e i 400nm, andando così simulare la luce del sole. Si fa quindi il rapporto tra la luce assorbita del cerotto contenente il solare e quello del cerotto senza, che farà da standard. Questo è solo un breve riassunto dell'esperimento di Diffey-Robson che però permette di capire i concetti fondamentali per quanto riguarda il calcolo dell'SPF in vitro. Al giorno d'oggi, infatti, procedure come quella NIPH, VUOS e SONING si basano sempre sul fatto che si applichi del solare su di un cerotto e se ne misuri

l'assorbanza. Ovviamente cambiano le tipologie di supporti utilizzati (per esempio, nel NIPH si usa una Mikelanta covering paper (S-HOBBY, s.r.o., Czech Republic), mentre nel SONING tracing paper (Canson, USA)), i tipi di lampade e di spettrofotometri. L'SPF, inoltre, non è più ottenuto in maniera diretta, ma si usano delle curve di calibrazione basate sui dati di numerosi esperimenti condotti nel corso degli anni (Bendova H 2007, KELLEY K A 1993, Padera F 2013-2014, DIFFEY B L 1989).

Le procedure in vitro non si limitano solo al calcolo dell'SPF, ma anche dell'UVA-PF, della lunghezza d'onda critica, del rapporto tra UVA/UVB, del Boot star rating e di tanti altri parametri.

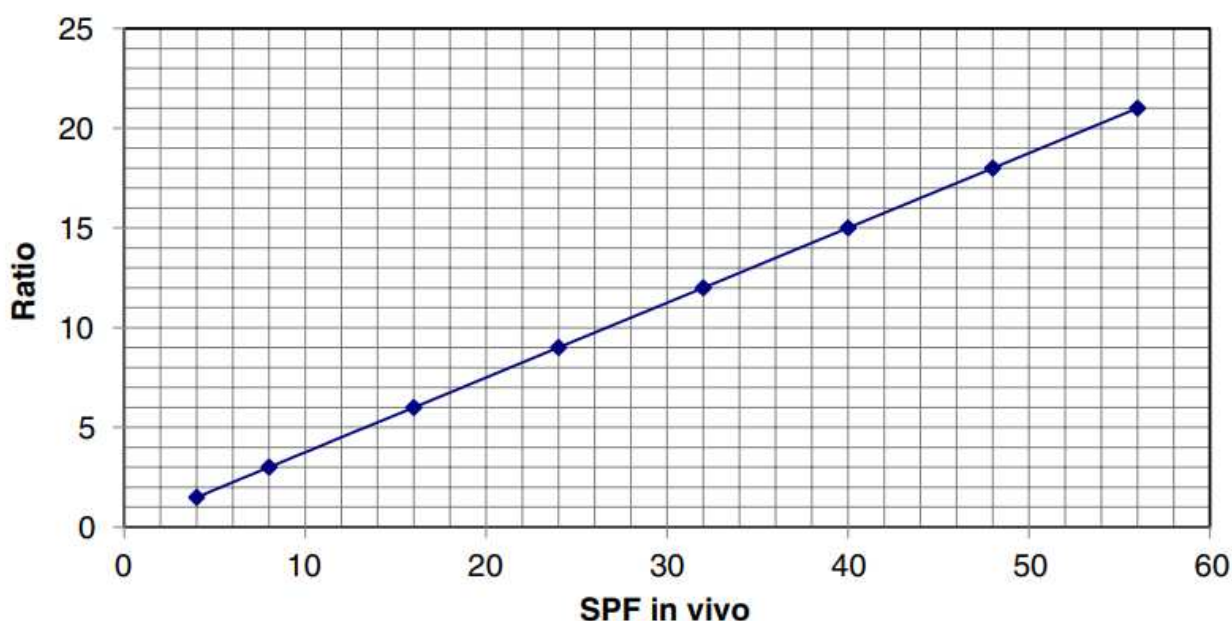


Figura 1-6: curva di calibrazione del metodo SONING

1.3.3 I Filtri UV

I filtri UV sono il cuore dell'industria dei solari e sono la componente attiva che ci protegge dagli effetti negativi delle radiazioni UV. Al momento non esiste una regolazione globale per questo tipo di molecole, in quanto paesi diversi classificano i solari in maniera diversa. Ad esempio, in America, la FDA (Food and Drug Administration) classifica i solari come medicinali da banco e riconosce 17 molecole come filtri UV. Al contrario, Europa e Australia classificano i solari come cosmetici e riconoscono rispettivamente 29 e 34 molecole come filtri (BHATTACHARJEE D 2021). Per quanto riguarda la classificazione dei filtri UV, questa è riportata in figura 1.3-6. Benché esistano molecole di origine naturale che posseggano azione foto-protettiva, queste non vengono usate frequentemente causa della loro scarsa efficacia nel proteggere la pelle. Infine, i filtri chimici sono divisi in tre

sottocategorie in base al range di radiazioni che assorbono: i filtri UVB assorbono principalmente tra i 290 e i 320nm (nell'UVB appunto) e il discorso è uguale ed opposto per i filtri UVA (assorbono quindi tra i 320 e i 400nm). Infine, i filtri ad ampio spettro si hanno grazie a più molecole associate che vanno a coprire in maniera uniforme tutto lo spettro UV, dando una protezione più completa. Per riportare il claim "ad ampio spettro", in America il solare deve avere una lunghezza d'onda critica maggiore di 370nm mentre in Europa è necessario che l'UVA-PF risulti essere almeno un terzo dell'SPF (Geoffrey K 2019, Sambandan D R 2011).

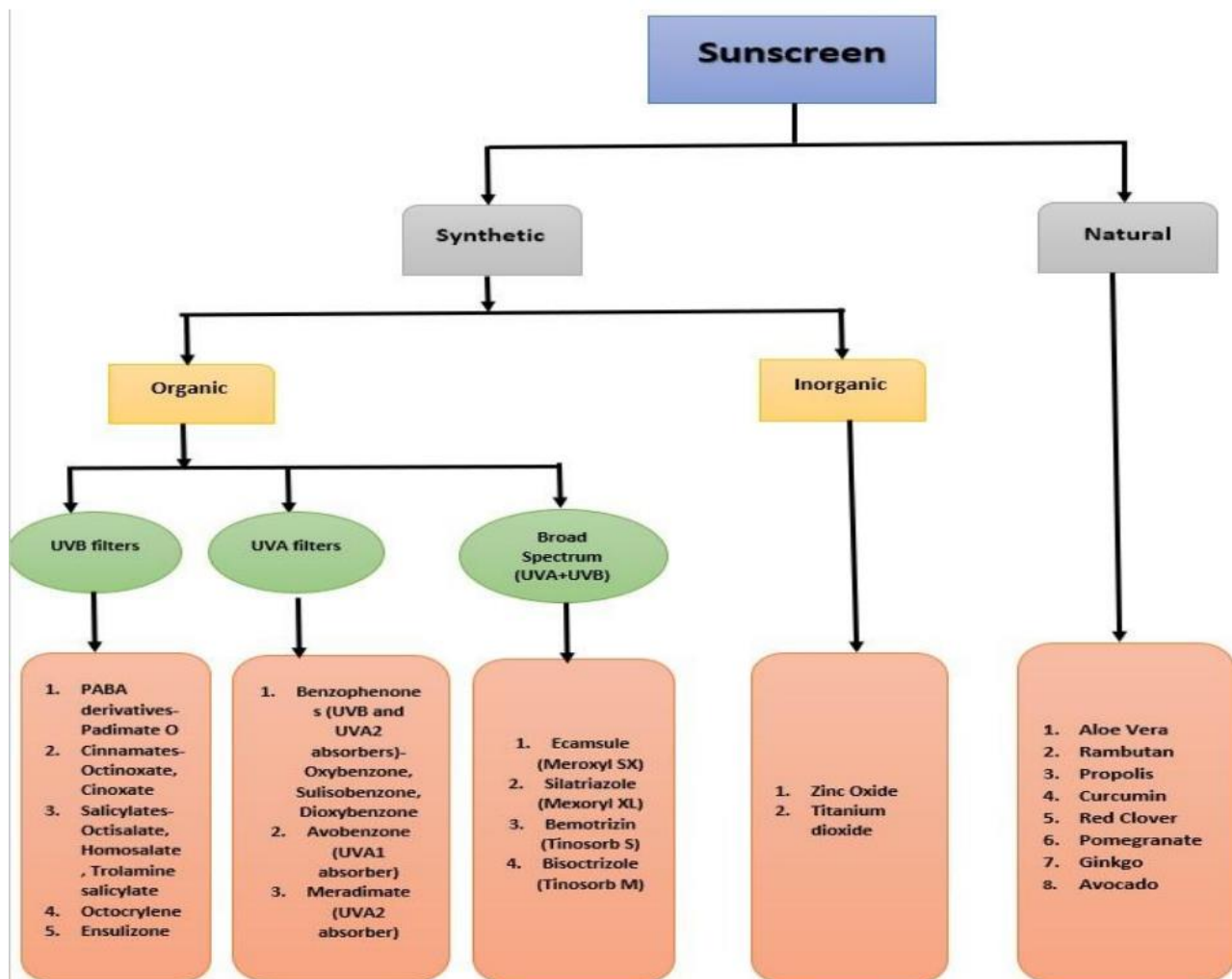


Figura 1-7: classificazione dei filtri UV

1.3.4 I Filtri Chimici

La maggior parte dei filtri chimici sono molecole organiche che presentano degli anelli aromatici coniugati. Gli elettroni di queste molecole sono capaci di assorbire e poi trasferire fotoni quando vengono colpiti da radiazioni UV. In particolare, quando queste molecole assorbono un fotone, un elettrone nell'orbitale molecolare occupato a maggiore energia (HOMO) passa dallo stato fondamentale allo stato eccitato, andando a occupare l'orbitale molecolare non occupato a minore energia (LUMO). Dallo stato di singoletto eccitato, l'elettrone torna rapidamente allo stato fondamentale in diversi modi: mediante emissione di calore, fluorescenza, emissioni nell'infrarosso. A volte può capitare che si passi da singoletto eccitato a tripletto eccitato, mediante intersystem crossing. In questo caso si può tornare allo stato fondamentale mediante fosforescenza o mediante reazioni fotochimiche, le quali vanno a minare la stabilità del prodotto (L. H. Wang S Q 2016). I filtri chimici hanno un'efficacia limitata a determinati range di lunghezze d'onda per cui nella formulazione di un solare si tende ad associare più molecole diverse, le quali vanno così a coprire in maniera completa l'intero spettro UV. Al momento i filtri chimici più comuni sono:

- 1 **DERIVATI DEL BENZOFENONE:** sono dei ketoni aromatici ed esistono più di dieci molecole che si rifanno alla struttura del benzofenone. È una molecola molto stabile e che assorbe sia negli UVA che negli UVB grazie alla presenza di un gruppo elettron-donatore (OCH₃) o in orto o in para. Se vengono assorbiti dai tessuti possono essere metabolizzati e degradati anche se di recente sono state sollevate delle polemiche per quanto riguarda il loro utilizzo;

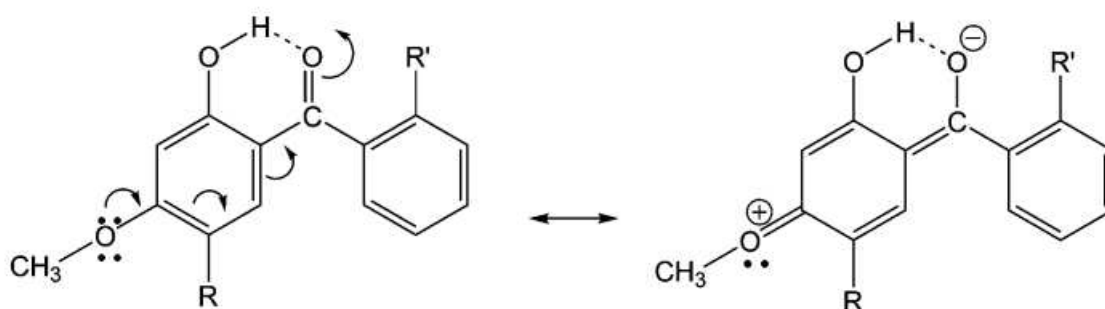


Figura 1-8: delocalizzazione di un elettrone del benzofenone

- 2 **SALICILATI:** Assorbono principalmente nell'UVB e, anche se non sono dei filtri molto efficaci, sono utilizzati molto spesso grazie alla loro elevata compatibilità con altri componenti del solare e alla loro capacità di solubilizzare molecole che risultano insolubili nella formulazione. La posizione in orto dell'ossidrilico rispetto a quella in para permette la creazione di un legame

idrogeno all'interno della stessa molecola, andando ad allungare la lunghezza d'onda critica da 260nm a 300nm;

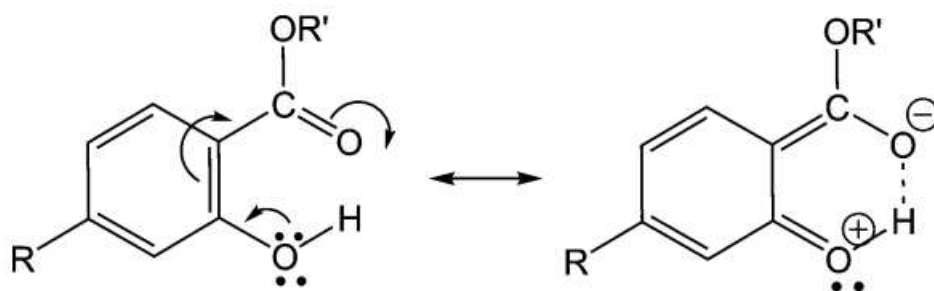


Figura 1-9: delocalizzazione degli elettroni nei salicilati

- 3 DERIVATI DEL DIBENZOILMETANO: il derivato più comune è l'avobenzone ed è efficace filtro per gli UVA. Assorbe le radiazioni mediante tautomeria keto-enolica e ha lunghezza d'onda massima a 357 nm. Il maggior problema di questa molecola risulta essere la sua foto-instabilità. Per rendere la molecola più stabile, spesso la si associa ad antiossidanti o quencher di vari tipi.

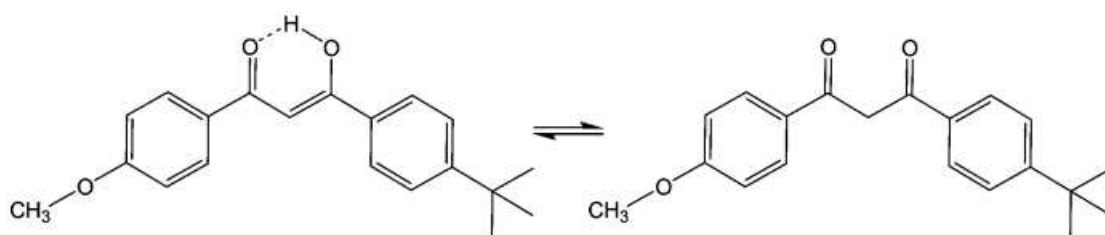


Figura 1-10: tautomeria keto-enolica dell'avobenzone

- 4 CINAMMATI: le molecole di questo gruppo posseggono un nucleo aromatico dotato sia di un gruppo elettrone donatore (OCH_3) che di un gruppo elettrone accettore (l'estere coniugato col doppio legame) permettendo un'ampia delocalizzazione degli elettroni. Sono delle molecole che assorbono molto nell'UVB e sono facili da maneggiare in forma liquida. Il problema legato a questo tipo di filtri è che perdono di efficacia a causa della foto-isomeria cis-trans, anche se esistono numerosi modi per prevenire che ciò avvenga.

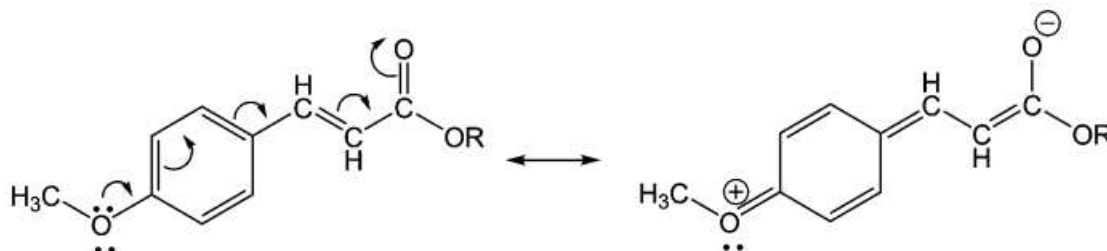


Figura 1-11: delocalizzazione di un elettrone in un cinammate

- 5 DERIVATI DELLA CANFORA: sono molecole bicycliche che permettono l'assorbimento di fotoni mediante isomeria cis-trans, dove la forma trans (E) risulta avere energia minore rispetto alla cis (Z). Sono molecole stabili, in quanto liberano l'energia assorbita sotto forma di calore, ma non sono biodegradabili e persistono nelle acque marine.

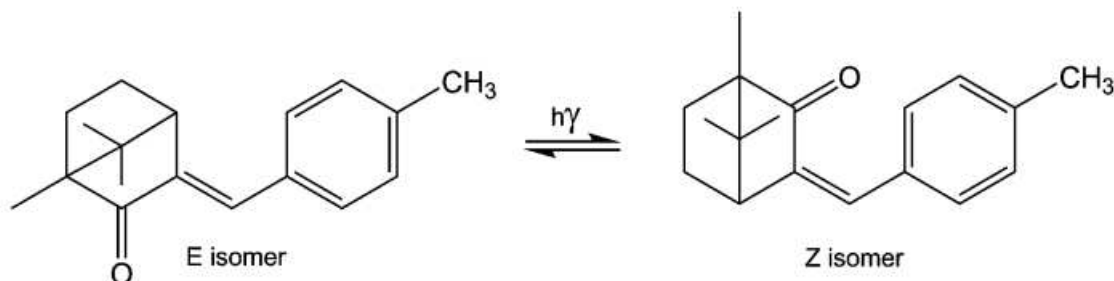


Figura 1-12: foto-isomeria dei derivati della canfora

- 6 DERIVATI DELLE TRIAZINE: il nucleo di questa classe di filtri consiste in un anello eterociclico a sei atomi contenente tre gruppi amminici in posizione 1-3-5. Questa molecola può essere funzionalizzata con numerosi gruppi diversi, i quali permettono di ottenere le caratteristiche desiderate. Di per sé, questo anello fornisce alle triazine una buona foto-stabilità ed un'elevata efficienza nell'assorbimento sia negli UVA che negli UVB (Sakamoto K 2017, L. H. Wang S Q 2016, Santosa B A.M.C 2018, S. N. A 2010)

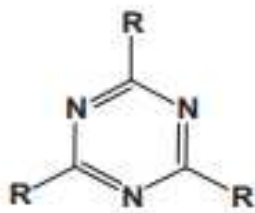


Figura 1-13: scheletro base delle triazine

1.3.5 I Filtri Fisici

Per quanto riguarda i filtri fisici, anche detti inorganici, l'ossido di zinco (ZnO) e il diossido di titanio (TiO₂) la fanno da padroni. Queste molecole fanno parte dei filtri solari fino dagli anni '80 del secolo scorso e si trovano in natura sotto forma di minerali (Sakamoto K 2017). Per quanto riguarda il TiO₂, in natura è presente in tre forme cristalline: rutilo, anastase e brokile. In particolare, il rutilo risulta essere la forma più comune e stabile. Presenta un indice di rifrazione di 3.6-4, che è responsabile dell'effetto bianco. ZnO invece si presenta in due forme cristalline: wurtzite e come miscela di zinco, dove la prima risulta essere la più comune. L'indice di rifrazione risulta essere di 2-2.3, portando così

ad un minore effetto bianco. Entrambe le molecole sono dei semiconduttori, questo vuol dire che la banda di valenza e quella di conduzione non sono sovrapposte ed è presente un piccolo gap di energia che deve essere superato per poter promuovere un elettrone nella banda di conduzione. Entrambe le molecole presentano un numero determinato e discreto di bande di valenza e di conduzione e l'energia necessaria per passare da una banda all'altra risulta essere di ~ 3.03 eV e di ~ 3.2 eV per il TiO_2 mentre di ~ 3.22 eV e di ~ 3.32 eV per il ZnO . Ciò spiega perché TiO_2 assorba soprattutto nell'UVB mentre ZnO assorba nell'UVA. Inoltre, questo fatto dà una spiegazione anche dell'effetto bianco dato dal TiO_2 : i fotoni con lunghezza d'onda nel visibile risultano avere energie di ~ 3.1 eV, i quali non vengono assorbiti ma attivamente riflessi andando così a colorare la pelle di bianco (L. H. Wang S Q 2016, Smijs T G 2011, Randazzo S 2016).

Fino ad una quindicina di anni fa si usavano soprattutto le forme micronizzate di queste due molecole, le cui dimensioni andavano dai 0.1 ai 10.0 μm . Con queste dimensioni TiO_2 assorbe principalmente nell'UVB mentre ZnO nell'UVA. Con l'avvento delle nanoparticelle le caratteristiche di questi due filtri sono cambiate: molecole di TiO_2 di dimensioni di 20-35nm risultano avere un'efficacia aumentata per quanto riguarda l'assorbimento di UVB ed un ridotto effetto bianco. Al contrario, molecole di ZnO di queste dimensioni perdono la capacità di proteggere nell'UVA e assorbono anch'esse nell'UVB. Per prevenire la perdita di una protezione completa nell'UV, si consiglia di unire nanoparticelle di TiO_2 con nanoparticelle di ZnO delle dimensioni di 130nm e 20nm in quanto le prime continuano a proteggere dagli UVA (Smijs T G 2011). Le nanoparticelle hanno anche creato nuove problematiche e preoccupazioni: alcuni ritengono che le ridotte dimensioni di queste molecole permettano loro di oltrepassare la barriera cutanea ed entrare nella circolazione sistemica. Per fortuna la maggioranza degli studi condotti su questo argomento concordano sul fatto che nano molecole di TiO_2 e ZnO non riescano ad oltrepassare lo strato corneo, indipendentemente che questo sia sano od alterato (Schneider S L 2019). Un altro problema legato alle dimensioni di queste molecole risulta essere l'assorbimento a livello polmonare, in quanto la IARC ha classificato il TiO_2 come possibile cancerogeno per l'uomo (gruppo 2B). Ciò è dovuto al fatto che ad alte concentrazioni, la polvere di TiO_2 , può causare il cancro nell'apparato respiratorio dei topi e queste reazioni risultano essere simili a quelle che avvengono nei polmoni di persone che lavorano in ambienti polverosi. Per quanto riguarda ZnO , l'FDA lo classifica come GRAS, ovvero "generally recognized as safe", mentre l'UE e l'US-EPA (US Environmental Protection Agency) non si sono ancora espresse in maniera ufficiale riguardo alla questione delle nano particelle. Il problema dell'assorbimento polmonare, benché reale, risulta essere rilevante solo per coloro che lavorano a contatto con queste polveri, in quanto il

consumatore che applica la crema solare non corre alcun rischio di questo tipo. Per quanto riguarda la creazione di radicali liberi, è risaputo che entrambe le molecole sono in grado di produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS) anche se il rischio di danni provocati da ROS in seguito all'applicazione di un prodotto solare contenente TiO₂ e ZnO è trascurabile, come risulta essere trascurabile il rischio di irritazione cutanea, fotosensibilizzazione, foto-irritazione e foto-tossicità (Smijs T G 2011, Schneider S L 2019).

In questo lavoro di tesi si sono usate due tipologie diverse di ZnO: coated e uncoated. Nel primo caso le molecole di ZnO sono rivestite di trietossicaprilolo silano, un derivato della silice con struttura riportata in figura 1-17. Questo generalmente va a formare un rivestimento mono-laminare per le molecole del filtro e serve per aumentare la sospensione e la stabilità del ZnO nella fase oleosa (Popp L 2019). È un rivestimento trasparente che non va a interferire con lo spettro di assorbimento del filtro (Świątczak D 2022). Questo vuol dire che entrambi i tipi di ZnO hanno la stessa efficacia per quanto riguarda la foto-protezione.

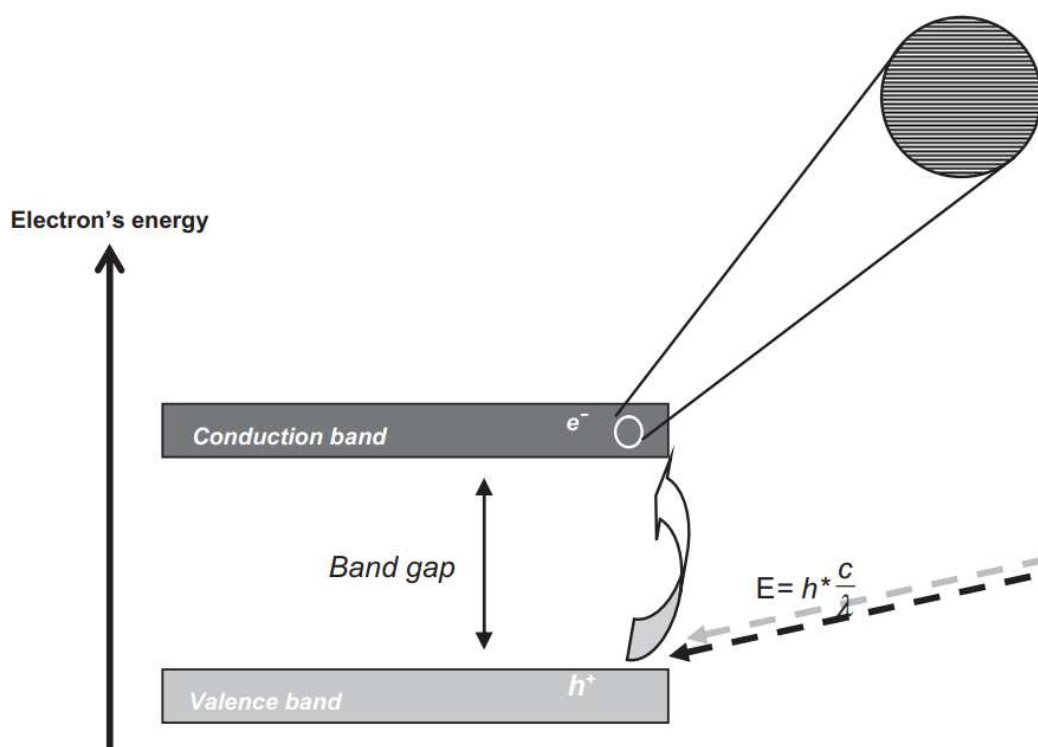


Figura 1-14: rappresentazione grafica della promozione di un elettrone dalla banda di valenza a quella di conduzione

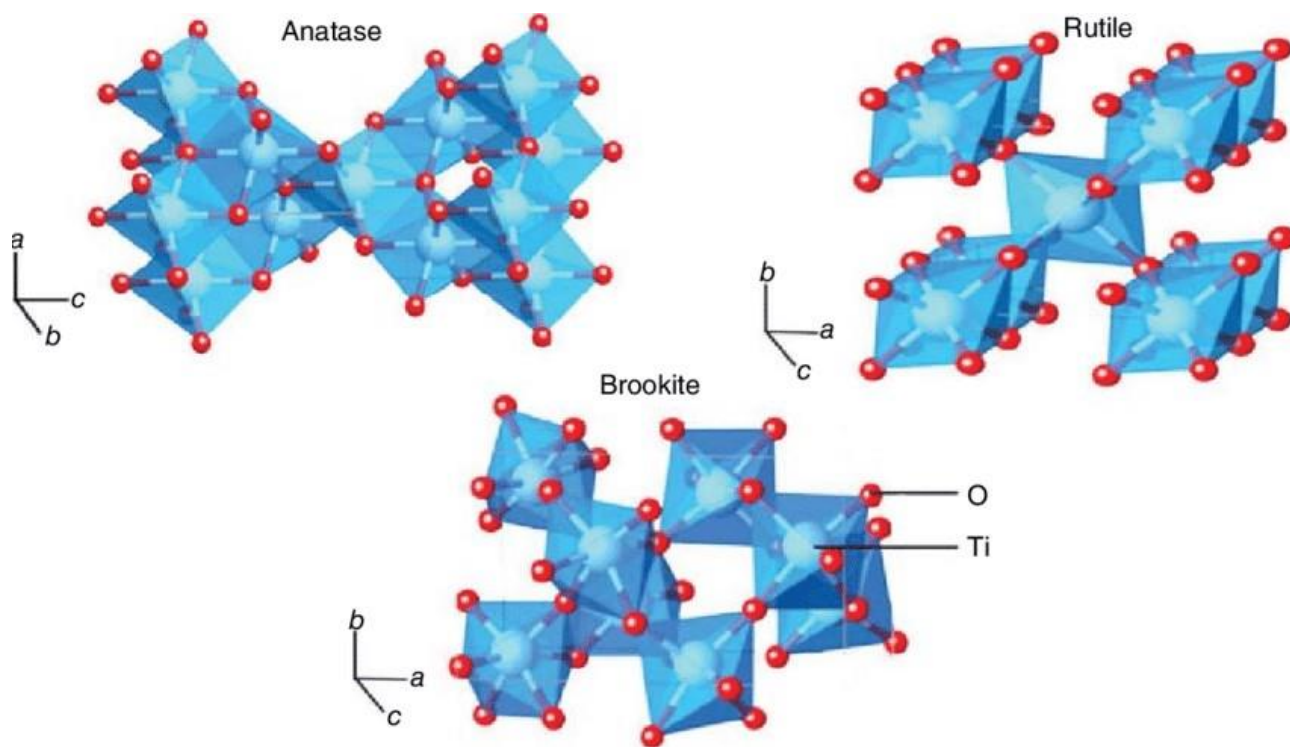


Figura 1-15: strutture cristalline del TiO_2

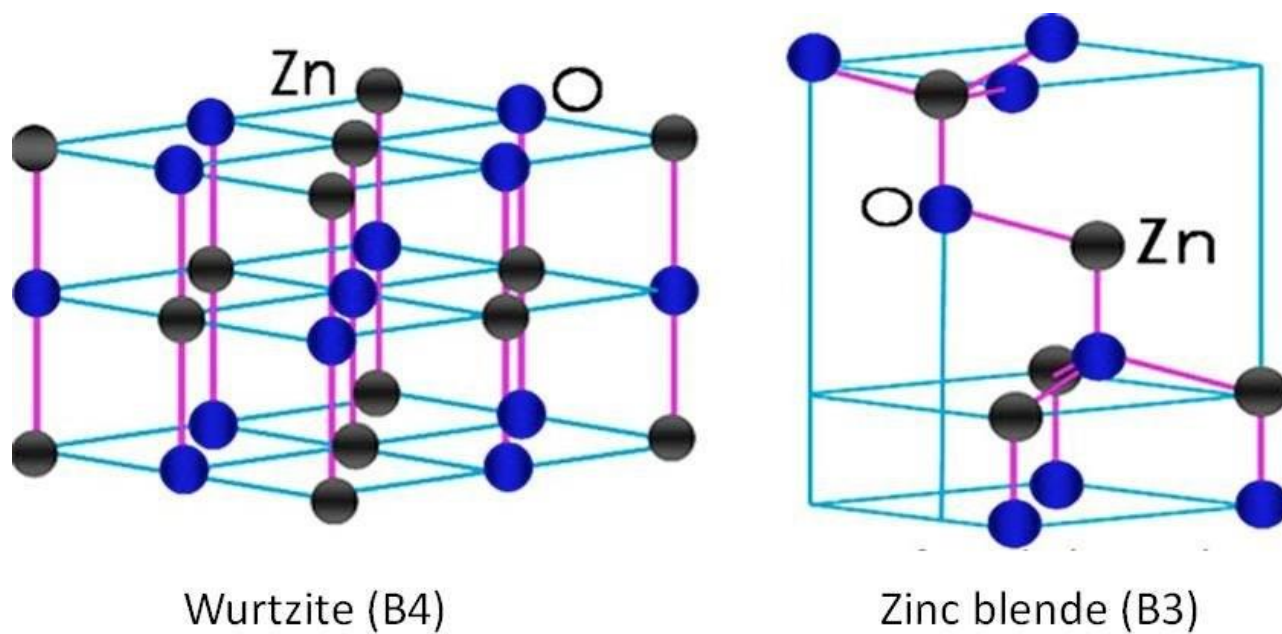


Figura 1-16: strutture cristalline del ZnO

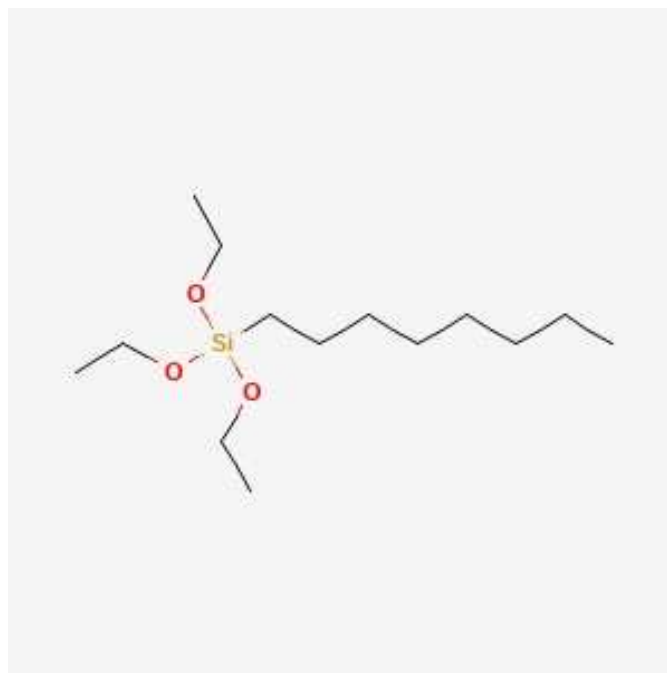


Figura 1-17: struttura chimica del trietossicaprioloil silano

1.4 Possibili impatti dei filtri solari nella barriera corallina

Il fatto che nei mari e negli oceani si possano trovare tracce di sostanze legate all'applicazione di prodotti solari non dovrebbe stupire nessuno. Al contrario, non molti sanno quali sono gli effetti che i filtri UV hanno sugli habitat marini: al momento si è certi che i filtri chimici sono tossici per alcune specie di alghe, cozze, crostacei, pesci e delfini (Jesus A 2022). Ultimamente però l'attenzione dei ricercatori si rivolta soprattutto sull'impatto che questi prodotti hanno sui coralli, in quanto alcuni ritengono che questi siano responsabili dello sbiancamento delle barriere coralline. Moltissime persone stanno cercando di capire se ciò è vero perché le barriere coralline sono l'habitat e/o la fonte di cibo del 25% di tutte le specie marine al mondo, oltre ad essere il sostegno economico di numerose persone che lavorano nel mondo del turismo, della pesca e della protezione delle costiere (Moeller M 2021). Per preservare la salute delle barriere coralline, in alcune località come le Hawaii, le isole Key West (Florida), Bonaire e Aruba (Olanda) ed alcune baie del Messico hanno deciso di bandire tutti i prodotti solari contenenti determinati filtri chimici, soprattutto benzofenone-3 (BP3) e l'etilesil metossicinnammato (EHMC) (L. A 2021). Detto ciò, benché così tanti animali e persone dipendano da questi, l'uomo è il più grande pericolo per i coralli: si ritiene che gli esseri umani siano responsabili della distruzione dal 20 al 50% delle barriere coralline negli ultimi 40 anni. La causa principale di questo fenomeno risulta essere l'innalzamento delle temperature delle acque degli oceani in quanto

ciò rompe il rapporto simbiotico tra i coralli e le alghe che li popolano. Se la temperatura dell'acqua si alza anche solo di uno o due gradi, i coralli entrano in una sorta di "febbre" e le alghe sulla loro superficie non trovano più un habitat adatto e migrano, privandoli della loro fonte di cibo e lasciandoli morire di fame. Ritornando a come i filtri UV entrino in contatto con i coralli, questo può avvenire in maniera diretta od indiretta: la prima fa riferimento alle particelle che vengono riversate in mare dai turisti che frequentano spiagge e fiumi mentre la seconda è collegata alle acque di scarico che defluiscono dalle città o dalle industrie ai mari. Per capire di quanto materiale stiamo parlando, Danovaro *et al.* (2008) stimarono che soltanto coloro che nuotano in mare sono responsabili del rilascio di una quantità di prodotti solari compresa tra le 4000 e le 6000 tonnellate all'anno e, poiché l'uso di prodotti solari è aumentato negli anni, sicuramente anche questi dati saranno aumentati. In aggiunta, ultimamente ci si è resi conto che gli impianti di depurazione delle acque di scarico non riescono a filtrare le molecole dei solari e ciò vuol dire che queste ultime risultano contaminate anche dopo i trattamenti di purificazione che subiscono (Tovar-Sanchez I A 2020). In generale, si stima che la quantità di filtri solari nelle acque vicino alle barriere coralline sia nell'ordine dei ng/L (ppt) o µg/L (ppb) anche se, l'aumento dell'uso di prodotti solari in aggiunta alla continua immissione di questi nell'ambiente ed il fatto che essi tendano a sedimentarsi nei fondali marini fa sì che i filtri UV possano essere considerati come degli inquinanti semi-permanenti (Schneider S L 2019).

Per quanto riguarda lo studio degli effetti dannosi dei filtri UV sui coralli, al momento mancano procedure standardizzate che permettano l'ottenimento di dati riconoscibili e condivisibili a livello globale. L'impossibilità di ideare esperimenti standardizzati è dovuta ad un'infinità di fattori che si possono ricollegare alle condizioni uniche ed estremamente delicate che permettono la crescita priva di stress di questi ultimi. Tra i fattori che rallentano lo sviluppo di queste procedure troviamo: il fatto che i coralli sono protetti dalla appendice 2 (e in alcuni casi addirittura 1) della CITES (Convenzione sul commercio internazionale delle specie minacciate di estinzione) che prevede l'ottenimento di numerosi certificati per il trasporto dei campioni, l'importazione di coralli da colture artificiali spesso implica che i campioni arrivino stressati in laboratorio e necessitano del tempo per tornare alle condizioni ottimali, parametri come luce, pH, salinità, quantità di ossigeno ... devono sempre essere sempre in precisi range. In aggiunta, i coralli presentano uno stadio larvale, uno giovanile e uno adulto, per cui tutti e tre gli stadi dovrebbero essere soggetti a questi esperimenti. Esiste quindi, oltre ad una variabilità specie-specifica, anche una variabilità fase-specifica che richiede condizioni a sé stanti. Oltre a tutte queste variabili per quanto riguarda le condizioni in cui condurre gli esperimenti, anche i meccanismi di azione dei filtri risultano essere estremamente variabili. Per esempio, C. F.

Stien D *et al.* (2019-2020) esposero dei frammenti di *Pocillopora damicornis* a differenti concentrazioni di ottocrilene (OCR) e scoprirono che questa molecola sembra indurre dei danni ai mitocondri. In uno studio condotto da He *et al* (2019), questi esposero diversi tipi di BP e di EHMC a dei frammenti di *P. damicornis* e di *Seriatopora caliendrum* per un periodo di 7-14 giorni. I risultati degli studi sulla tossicità dei singoli filtri si possono classificare nel seguente ordine: BP-8 > BP-1 > BP-3 > EHMC > BP-4 e come meccanismo d'azione venne proposto l'aumento dello stress ossidativo con la possibile induzione di genotossicità. Infine, Downs *et al* (2016) esposero delle larve di *Stylophora pistillata* a diverse concentrazioni di BP-3 in cicli di luce e buio di massimo 24 ore. Gli autori conclusero che in presenza di luce si verificarono danni diretti alla simbiosi tra coralli ed alghe mentre, al buio, si verificavano degli eventi di simbiofagia da parte del corallo verso le alghe, portando così allo sbiancamento dei coralli in entrambi i casi.

Questa paratesi sui coralli serve per far capire meglio perché è necessario sviluppare dei prodotti più eco-sostenibili e perché l'utilizzo di booster naturali risulti essere al centro dell'attenzione di molti ricercatori.

Marine Organism	Species	UV Filter	Concentration	Negative Effects
Corals	<i>Pocillopora damicornis</i> , <i>Seriatopora caliendrum</i> , <i>Stylophora pistillata</i> , <i>Acropora</i> spp.	Benzophenone-3 (10)	31.8 ng/g	Not described
	<i>Acropora</i> spp.	Zinc Oxide (35)	-	Coral bleaching
Algae	<i>Tetraselmis</i> sp.	Homosalate (8)	1 mg/L	Growth inhibition
		Benzophenone-3 (10)	-	Changes in cell morphology
	Avobenzone (11)			
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Benzophenone-1	5 mg/L	Growth inhibition
	Benzophenone-3 (10)	Decrease of photosynthetic pigments		
Brine Shrimp	<i>Artemia salina</i>	Homosalate (8)		Induce mortality in 54%
		Avobenzone (11)	2 mg/L	Induce mortality in 64%
		Octocrylene (30)		Induce mortality in 88%
Crustaceans	<i>Daphnia magna</i>	Avobenzone (11)	200 µg/L	Induce metabolic disruption
		Octocrylene (30)	200 µg/L	Reduce ability to detect light stimuli Behavioural changes
Dolphins	<i>Pontoporia blainvillei</i>	Octocrylene (30)	782 ng/g	Bioaccumulation and biomagnification
Fish	<i>Danio rerio</i>	3-(4-methylbenzylidene) camphor (7)	0.19–0.77 mg/L	Induce malformations Decrease heart rate Affecting sexual differentiation Induce neurotoxicity
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ethylhexyl methoxycinnamate (21)	96.0–395.6 µg/kg	Changes in metabolic pathway Increasing of leukocytes Oxidative stress

Figura 1-18: effetti dei filtri UV sugli organismi marini



Figura 1-19: riassunto delle variabili per lo sviluppo di esperimenti standardizzati dui coralli

1.5 *Pongamia Pinnata* L.

Pongamia pinnata L. è una specie indo-malese, diffusa in tutto il sud-est asiatico, in regioni come India, Australia, Filippine... È una pianta ai mille nomi, tra i più comuni troviamo: *Millettia pinnata* (L.) Panigrahi, *Pongamia glabra* (Vent.), e *Derris indica* (Lam.). Paesi diversi chiamano questa pianta con nomi diversi, i più comuni tuttavia sono: karanja (Hindi, Bangladesh), ki pahang laut (Indonesia), kacang kayu laut (Malaya) e pongam oil tree/indian beech (Inghilterra) (Sangwan S 2010, Degani E 2022). Appartiene alla famiglia delle Fabaceae (Leguminosae), in particolare alla sottofamiglia delle Papilionoidea. Cresce dal livello del mare fino ai 1200 m e non ha particolari esigenze per la coltivazione: cresce spontaneamente vicino a torrenti e fiumi ma sopravvive anche in terreni poveri e sopporta molto bene i terreni salini (Sangwan S 2010, Al Muqarrabun L.M.R. 2013, Degani E 2022, Badole S L 2013, Marriboina S 2021). È un albero che cresce velocemente e può arrivare a 20 metri di altezza, deciduo e glabro, con periodo di fioritura che va da marzo ad aprile (Sangwan S 2010, Singha K T 2019). La corteccia è marrone-grigiastra, liscia o ricoperta di tubercoli. Le foglie sono alterne, dispari e prive di peli. Si presentano di colore rosso-rosate da giovani e

diventano lucide, di un verde intenso una volta mature. I fiori sono riuniti in infiorescenze raceme, lunghe dai 6 ai 27cm, da bianchi a rosati, profumati, appaiati lungo il rachide (Aeri V 2020, Sangwan S 2010). L'apparato radicale presenta un fittone che può arrivare fino a 10m di profondità e da cui si sviluppa una fitta rete di radici secondarie, le quali conferiscono alla pianta la capacità di resistere ad ambienti aridi e salini. Queste sono in grado di fissare l'azoto nel terreno grazie alla simbiosi con batteri del genere *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (Degani E 2022). I semi sono generalmente uno, raramente due, ellittici o reniformi, larghi 1,7–2,0 cm, rugosi e con testa coriacea bruno-rossastra (Singha K T 2019). Dai semi si ricava un olio di colore giallo-arancio, tendente al marrone, il quale viene usato in molti modi diversi, come: olio da cucina, lubrificante, fertilizzante, pesticida, rimedio tradizionale contro reumatismi e malattie della pelle. Questo contiene in media dal 0.3% al 0.9% di *pongamolo*, la molecola responsabile dell'effetto booster dell'SPF (Degani E 2022). Il *pongamolo* è un di-ketone che presenta due anelli aromatici, i quali sono collegati mediante un sistema di carbonili α - β insaturi (Rekha M J 2020). Appartiene alla categoria dei calconi, più precisamente dei furano-calconi, e fu isolato per la prima volta da Rangaswami e Seshadri nel 1942 (RANGASWAMI S 1942, Al Muqarrabun L.M.R. 2013, RANGASWAMI S 1954, Suyambulingama A 2000). Il nome completo di questa molecola è 1-(4-metossi-5-benzofuranil) -3-fenil-1,3-propan-dione e la sua struttura è riportata nelle figure 1.5-2 e 1.5-3, in quanto può dare tautomeria keto-enolica. Il punto di fusione è a 124.8°C e la lunghezza d'onda di assorbimento massima a 350nm (Jahan S 2021, Radice M 2016, Rekha M J 2020). Negli ultimi anni il *pongamolo* è stato al centro di numerose ricerche in quanto sembra avere delle potenzialità nell'uso medico come antiossidante, antitumorale e antidiabetico oltre a una bassa, se non nulla, tossicità. L'olio di semi invece viene studiato come potenziale biodiesel e come potenziale olio per il consumo umano (Al Muqarrabun L.M.R. 2013, Marone P A 2022).



Figura 1-20: Illustrazione della pianta di P. Pinnata con relative infiorescenze e frutti

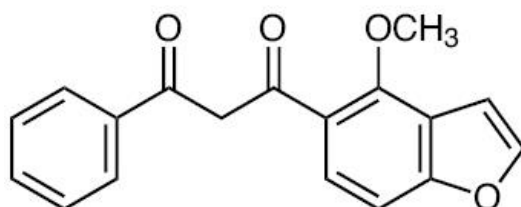


Figura 1-21: Struttura molecolare del pongamolo in forma chetonica

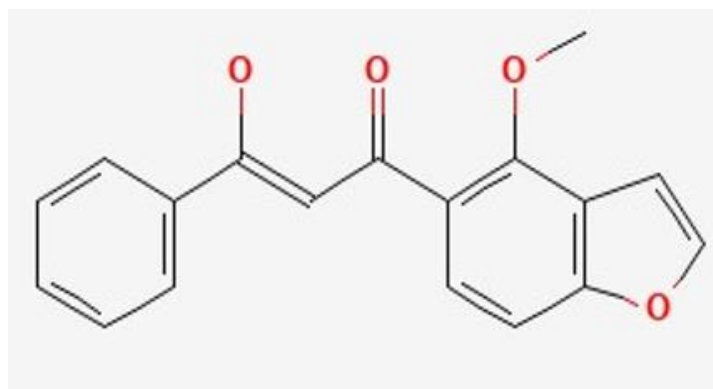


Figura 1-22: struttura molecolare del pongamolo in forma enolica

2 SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi si è sviluppato un approccio formulativo ecosostenibile al design di un solare ed elevato fattore di protezione. Tale strategia ha previsto la scelta di filtri minerali e chimici unitamente al *pongamolo* come booster. La presenza dell'estratto di *P. pinnata*, ed in particolare del *pongamolo*, ha lo scopo di ridurre la quantità necessaria di filtri UV, in modo da attenuare l'inquinamento delle acque marine. Ciò non si limita ai filtri chimici, in quanto sono il pericolo maggiore per le barriere coralline, ma anche al ZnO e al TiO₂ i quali, benchè più eco-friendly, risultano comunque estranei a quell'habitat. Successivamente, sempre per sviluppare un prodotto il più sostenibile possibile, si è deciso di associare alla *P. pinnata* l'acido ferulico in quanto è una molecola con dichiarata attività antiossidante, allo scopo di ottenere un ulteriore incremento dell'SPF e dell'attività antiossidante del prodotto.

3 PARTE SPERIMENTALE

3.1 Strumenti e reagenti

- Centrifuge RE.MI XS R-8D (REMI Group, Mumbai, India),
- DU-65 Digital ultrasonic cleaner (Argolab, Carpi, Italy),
- pH meter Seven Compact (Mettler Toledo, OH, Columbus, USA), Densimeter Easy D30 (Mettler Toledo, Columbus, USA),
- Turbo-emulsifier Silverson L2R (Silverson, Waterside - Chesham, UK),
- UV-Vis V-730 (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan),
- Vetreria di Laboratorio,
- Viscometer Brookfield DV2T (Brookfield, Middleboro, MA, USA),
- Parsol® 1789 - Butyl Methoxydibenzoylmethane – AVO (DSM, Heerlen, The Netherlands),
- Tinosorb® S - Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine –BEMT (BASF, Ludwigshafen, Germany),
- Uvinul® A Plus Granular - Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate – DHHB (BASF, Ludwigshafen, Germany),
- Uvinul® MC 80 - Ethylhexyl Methoxycinnamate –OM (BASF, Ludwigshafen, Germany),

- Uvinul® T 150 - Ethylhexyl Triazone – EHT (BASF, Ludwigshafen, Germany),
- ZnO cosmetic grade (EverCare, Eijsden, The Netherlands), TiO2 cosmetic grade (ACEF, Fiorenzuola d'Arda, Italy).

3.2 Metodi

3.2.1 Preparazione dell'emulsione

Le formule impiegate per la produzione e le analisi delle creme solari sono di seguito riportate:

Tabella 1: formula quali quantitativa riferita all'emulsione contenente TiO₂.

Fase	Nome commerciale	INCI	Funzione	%
A	Olivem 1000	<i>Cetearyl Olivatate, Sorbitan Oil</i>	Emulsionante	3.00
	Cutina GMS	<i>Glyceryl Stearate</i>	Emolliente/emulsionante	2.00
	Cetil alcol	<i>Cetyl Alcohol</i>	Emolliente/emulsionante	1.00
	Ottil palmitato	<i>Ethylhexyl Palmitate</i>	Emolliente	5.00
	Cetiol C5	<i>Coco-Caprylate</i>	Emolliente	2.00
	Olio di jojoba	<i>Simmondsia Chinensis Seed Oil</i>	Emolliente	5.00
	Vitamina E acetato	<i>Tocopheryl acetate</i>	Antiossidante	1.00
B	Parsol TX	<i>Titanium Dioxide</i>	Filtro solare	12.00
C	Assure +	<i>Pongamia pinnata seed extract</i>	Booster	0.25
	Cetiol C5	<i>Coco-Caprylate</i>	Solvente/emolliente	2.00
	Glicerolo	<i>Glycerin</i>	Umettante	3.00
D	Smoothflow	<i>Xanthan Gum</i>	Texturizzante/stabilizzante	0.50
	Vitacel CS20	<i>Cellulose</i>	Viscosizzante	2.50
	Euxyl PE 9010	<i>Phenoxyethanol Ethylh</i>	Conservante	1.00
	Sodio Gluconato	<i>Sodium Gluconate</i>	Chelante/regolatore di pH	0.20
	Amihope LL	<i>Lauroyl Lysine</i>	Viscosizzante	1.00
	Water	<i>Acqua</i>	Idratante/solvente	58.55

Tabella 2: formula quali quantitativa riferita all'emulsione contenente ZnO coated

Fase	Nome commerciale	INCI	Funzione	%
A	Olivem 1000	Cetearyl Olivat. Sorbitan Oil	Emulsionante	3.00
	Cutina GMS	Clyceryl Stearate	Emolliente/emulsionante	2.00
	Cetil alcol	Cetyl Alcohol	Emolliente/emulsionante	1.00
	Otil palmitato	Ethylhexyl Palmitate	Emolliente	5.00
	Cetiol C5	Coco-Caprylate	Emolliente	2.00
	Olio di jojoba	Simmondsia Chinensis Seed Oil	Emolliente	5.00
	Vitamina E acetato	Tocopheryl acetate	Antiossidante	1.00
	Dispersun OL 100	PHSA	Surfattante	0.80
B	Zano 10 Plus	Zinc Oxide, Triethoxycaprylylsilane	Filtro solare	20.00
C	Assure +	Pongamia pinnata seed extract	Booster	0.25
	Cetiol C5	Coco-Caprylate	Solvente/emolliente	2.00
D	Glicerolo	Glycerin	Umettante	3.00
	Smoothflow	Xanthan Gum	Texturizzante/stabilizzante	0.50
	Euxyl PE 9010	Phenoxyethanol Ethylh	Conservante	1.00
	Sodio Gluconato	Sodium Gluconate	Chelante/regolatore di pH	0.20
	Water	Acqua	Idratante/solvente	53.25

Tabella 3: formula quali quantitativa riferita all'emulsione contenente ZnO uncoated

Fase	Nome commerciale	INCI	Funzione	%
A	Olivem 1000	Cetearyl Olivat. Sorbitan Oil	Emulsionante	3.00
	Cutina GMS	Clyceryl Stearate	Emolliente/emulsionante	2.00
	Cetil alcol	Cetyl Alcohol	Emolliente/emulsionante	1.00
	Otil palmitato	Ethylhexyl Palmitate	Emolliente	5.00
	Cetiol C5	Coco-Caprylate	Emolliente	2.00
	Olio di jojoba	Simmondsia Chinensis Seed Oil	Emolliente	5.00
	Vitamina E acetato	Tocopheryl acetate	Antiossidante	1.00
	Dispersun OL 100	PHSA	Surfattante	0.80
B	Zano 10	Zinc Oxide	Filtro solare	20.00
C	Assure +	Pongamia pinnata seed extract	Booster	0.25
	Cetiol C5	Coco-Caprylate	Solvente/emolliente	2.00
	Glicerolo	Glycerin	Umettante	3.00
D	Smoothflow	Xanthan Gum	Texturizzante/stabilizzante	0.50
	Euxyl PE 9010	Phenoxyethanol Ethylh	Conservante	1.00
	Sodio Gluconato	Sodium Gluconate	Chelante/regolatore di pH	0.20
	Water	Acqua	Idratante/solvente	53.25

Tabella 4: formula quali quantitativa riferita all'emulsione contenente filtri chimici organici

Fase	Nome commerciale	INCI	Funzione	%
A	Olivem 1000	Cetearyl Olivates, Sorbitan Oil	Emulsionante	3.00
	Cutina GMS	Clyceryl Stearate	Emolliente/emulsionante	2.00
	Cetil alcol	Cetyl Alcohol	Emolliente/emulsionante	1.00
	Ottil palmitato	Ethylhexyl Palmitate	Emolliente	5.00
	Cetiol C5	Coco-Caprylate	Emolliente	2.00
	Olio di jojoba	Simmondsia Chinensis Seed Oil	Emolliente	5.00
	Vitamina E acetato	Tocopheryl acetate	Antiossidante	1.00
B	Tinosorb S	Bis-ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	Filtro solare	4.00
	Uvinul A Plus Granular	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	Filtro solare	4.00
	Uvinul MC80	Ethylhexyl methoxycinnamate	Filtro solare	4.00
	Uvinul T 150	Ethylhexyl triazone	Filtro solare	2.00
C	Assure +	Pongamia pinnata seed extract	Booster	0.25
	Cetiol C5	Coco-Caprylate	Solvente/emolliente	2.00
	Glicerolo	Glycerin	Umettante	3.00
D	Smoothflow	Xanthan Gum	Texturizzante/stabilizzante	0.50
	Vitacel CS20	Cellulose	Viscosizzante	2.50
	Euxyl PE 9010	Phenoxyethanol Ethylh	Conservante	1.00
	Sodio Gluconato	Sodium Gluconate	Chelante/regolatore di pH	0.20
	Amihope LL	Lauroyl Lysine	Viscosizzante	1.00
	Water	Acqua	Idratante/solvente	56.55

Per preparare le creme solari descritte nelle tabelle dalla 1 alla 4 si è scelto di fare un'emulsione olio in acqua (O/A) contenente i filtri nella fase oleosa. Si prepara la fase A, pesando i vari componenti e mettendoli a scaldare tutti assieme su di una piastra riscaldante alla temperatura di 180°C. Quasi contemporaneamente si prepara l'estratto di *P. pinnata*: pesando il Cetiol C5 in un becher da 100 mL e aggiungendo l'estratto accuratamente pesato. La preparazione viene lasciata su di una piastra riscaldante alla temperatura di 100°C sotto agitazione costante a circa 250 rpm. Si prepara la fase acquosa pesando in un becher da 600mL tutti i componenti esclusi l'acqua, la gomma xantana ed euxyl i quali andranno aggiunti per ultimi. Una volta che la fase oleosa si è sciolta completamente, si aggiunge la fase B alla A. Per quanto riguarda i filtri fisici, questi si presentano sotto forma di polvere e, in questo caso, si versano 10-15 g di polvere alla volta mescolando con una spatola per far sì che le sostanze vengano incorporate in maniera graduale ed omogenea. Ripetere l'operazione fino ad

arrivare alla quantità desiderata. Una volta aggiunti i filtri, assicurarsi che la fase oleosa sia ancora calda, in caso contrario è necessario riscaldare il tutto. Si pesa l'acqua e la si riscalda fino a 60°C, successivamente quest'ultima viene unita ai componenti della fase D e opportunamente mescolata. A questo punto si versano a filo piccole quantità di fase oleosa nell'acqua omogenizzando con un Turbo-emulsionatore (Silverson L2R, Waterside - Chesham, UK). A mano a mano che si procede con l'aggiunta della fase oleosa vengono aumentati gradualmente gli rpm, mescolando delicatamente con una spatola fino a che l'emulsione appare completa. Si aggiunge all'emulsione lo smoothflow e l'euxyl e si omogenizza nuovamente. A questo punto si prelevano circa 50-100 g di crema conservandoli a parte, poiché questa frazione servirà come standard di riferimento. Al resto della crema si aggiunge l'estratto di *P pinnata* disciolto, mescolando vigorosamente per l'ultima volta col silverson. Ottenuti i campioni con il *pongamolo*, si procede prelevando 98 g e si aggiungono 4 g di soluzione alcolica contenente acido ferulico in rapporto 4:1. Questa procedura ci ha consentito di ottenere tre creme solari per ogni tipologia di filtro solare:

- Crema standard, con solo il filtro;
- Crema con il filtro e *pongamolo*;
- Crema a cui si è associato l'acido ferulico all'estratto di *P. pinnata* L.

3.2.2 Analisi Chimico-Fisiche sul prodotto finito

3.2.2.1 Viscosità

Per misurare la viscosità (μ) delle emulsioni formulate è stato utilizzato un viscosimetro rotativo Brookfield con uno spindle SC4-29.



Figura 3-2: Densimetro digitale Mettler Toledo

Si procede riempiendo lo strumento tramite siringa con il prodotto da analizzare. L'analisi procede in automatico con accuratezza di $\pm 0.0005 \text{ g/cm}^3$.

3.2.2.3 pH

Per la misurazione del pH si è impiegato un pH-metro da banco calibrato con due o tre soluzioni tampone standard (4.01, 7.00 e 11.00). L'elettrodo a vetro è generalmente conservato immerso in una soluzione 3 M di KCl per impedire la disidratazione della membrana. Si evita l'uso di acqua distillata poiché potrebbe estrarre per osmosi gli ioni idrogeno presenti all'interno dell'elettrodo.

Il pH delle emulsioni è stato corretto con una soluzione di idrossido di sodio al 20%.

3.2.2.4 Centrifuga

Le emulsioni, siano esse O/A o A/O, si caratterizzano per un'elevata instabilità intrinseca: la gravità, infatti, esercita sulle piccole gocce disperse una forza capace di determinarne l'unione e la successiva sedimentazione sul fondo o ascensione in superficie. A lungo andare questo processo, oltre ai fenomeni intermedi di flocculazione, coalescenza e sedimentazione, può portare alla separazione completa delle fasi (interna ed esterna) nei due componenti originali, con una conseguente perdita di efficacia del prodotto. Per questa ragione è fondamentale compiere dei test di stabilità accelerata

servendosi della centrifuga da laboratorio. Questo strumento, attraverso l'uso dell'accelerazione centrifuga, simula la gravità esercitata sul composto nell'arco di un anno portando alla luce eventuali fenomeni di separazione e quindi sedimentazione tra corpi di diversa densità. Si tratta dell'applicazione del principio di Archimede e della legge di Stokes.

Sono stati prelevati 30g circa da ogni emulsione e inseriti all'interno di apposite provette Falcon™. Una volta poste nella centrifuga sono state centrifugate per 10 minuti a 6000 RPM e successivamente valutate visivamente.

3.2.3 Calcolo SPF in vitro con metodo Diffey-Robson

Il test in vitro non può essere considerato un'alternativa al metodo in vivo ma può essere utile come screening per la selezione tra i prodotti.

Il principio della determinazione dell'SPF in vitro è stato per la prima volta teorizzato ed applicato da Brian L. Diffey e J. Robson nel 1989: il metodo è basato sulla misura della trasmittanza spettrale di un prodotto, ovvero dal rapporto tra la radiazione trasmessa dal campione e la radiazione totale incidente.

Applicando una quantità nota di prodotto su un opportuno substrato di superficie prefissata, in modo tale da ottenere un film traslucido omogeneo, si ottiene la trasmittanza spettrale monocromatica $T(\lambda)$:

$$T(\lambda) = \frac{S_s(\lambda)}{S_0(\lambda)}$$

Dove:

- $S_s(\lambda)$ è la trasmittanza del substrato alla lunghezza d'onda λ ;
- $S_0(\lambda)$ è la trasmittanza del substrato quando su di esso è stato stratificato il campione.

Quantificando ogni 0,5 nm tale valore, nell'arco totale delle lunghezze d'onda (290-400 nm), si ottiene il valore di SPF del prodotto, dato dall'equazione:

$$SPF = \frac{\sum_{290}^{400} E(\lambda)B(\lambda)}{\sum_{290}^{400} E(\lambda)B(\lambda)T(\lambda)}$$

Dove:

- $E(\lambda)$ è l'irradianza spettrale della luce solare.
- $B(\lambda)$ è spettro di azione eritematosa della radiazione solare.

L'analisi del prodotto secondo questa metodica consente di ottenere tre diversi valori principali:

- Rapporto UVA/UVB.
- Fattore di protezione solare (SPF).
- Fattore di protezione UVA.

Le analisi sono state condotte attraverso metodo Diffey-Robson, il quale prevede l'utilizzo di un nastro chirurgico Leukofix, sufficientemente trasparente alla luce UV-Vis ed in grado di simulare la texture dell'epidermide umana. Per la determinazione della trasmittanza è stato utilizzato uno spettrofotometro UV-Vis JASCO mod. V-730PC.

Il protocollo di lavoro adottato dal laboratorio interno all'azienda prevede:

- superficie di dimensioni 5cm x 5cm
- dose applicata pari a 2.00 ± 0.04 mg/cm²

Per ogni formulazione vengono preparati ed analizzati almeno 3 supporti, per ognuno dei quali sono eseguite 6 scansioni in parti differenti della superficie del cerotto stesso. Tale metodologia permette di garantire una discreta riproducibilità dei dati ottenuti.

3.2.4 Analisi DPPH

L'attività antiossidante dei campioni è stata valutata usando il saggio del DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Il principio si basa sul viraggio di colore in seguito alla reazione del radicale picrilidrazilico con la molecola antiossidante. La reazione è schematizzata in Figura 3-3:

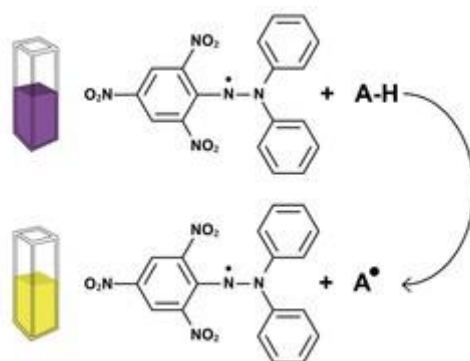


Figura 3-3: Reazione del radicale DPPH con la molecola antiossidante. La protonazione determina un viraggio della colorazione dal viola al giallo acceso

Il primo passo consiste nel preparare una retta di taratura in modo da poter ricavare le concentrazioni di DPPH in ogni momento. Dalla retta si è ricavata l'equazione presente nella figura n 3-4. Concluso ciò, si preparano i campioni da analizzare pesando, in matracci tarati da 50 mL, 1g di crema. Si porta a volume con acqua distillata e si agita per dieci minuti con agitatore magnetico. I matracci vengono poi inseriti in un bagno ad ultrasuoni, DU-65 Digital ultrasonic cleaner (Argolab, Carpi, Italy) e vengono sonicati per 10 minuti. Successivamente, si versa una quantità a scelta di soluzione in contenitori tipo vial, assicurandosi che tutte e 3 i campioni preparati contengano la stessa quantità di sostanza e si centrifugano per 10 minuti, in questo caso si è utilizzata una centrifuga RE.MI XS R-8D (REMI Group, Mumbai, India), a 5000 rpm. Dopo la separazione delle due fasi viene prelevata la componente acquosa, la quale viene filtrata. A questo punto, si preparano i campioni per la lettura spettrofotometrica prelevando 0.2 mL di soluzione precedentemente filtrata e vengono aggiunti 2.5 mL di DPPH 61 μ M.

Le soluzioni così ottenute vengono poste in una cuvetta di quarzo ed analizzate per valutare l'assorbanza alla lunghezza d'onda critica di 517nm.

Le letture allo spettrofotometro vengono eseguite in funzione del tempo:

- 1 minuto,
- 5 minuti,
- 15 minuti,
- 30 minuti.

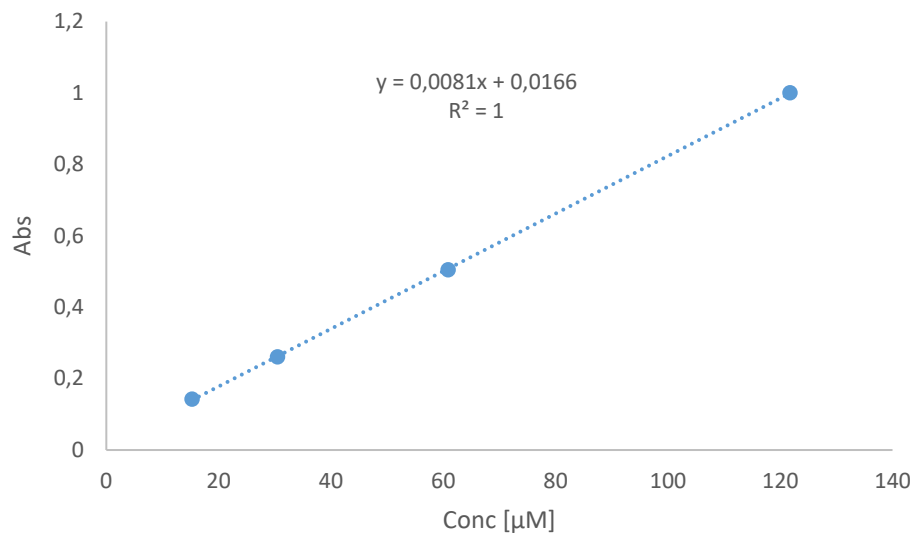


Figura 3-4: Retta di calibrazione relativa al viraggio di colore del DPPH

3.3 Risultati e discussione

Qui di seguito sono riportati i risultati dei test svolti in laboratorio

3.3.1 Analisi Chimico-Fisiche

Tabella 5: parametri chimico-fisici misurati per le emulsioni dopo la loro preparazione

	Parametro	Base	Filtro + Pongamolo	Filtro + Pongamolo + Acido Ferulico
Filtri chimici	Viscosità [cPs]	20842	21000	19550
	pH	5.80	5.98	5.57
	Densità [g/ml]	0.988	0.986	0.985
	Centrifuga	Stabile	Stabile	Stabile
ZnO uncoated	Viscosità [cPs]	25100	26580	25088
	pH	7.28	7.22	7.05
	Densità [g/ml]	1.120	1.128	1.122
	Centrifuga	Stabile	Stabile	Stabile
ZnO coated	Viscosità [cPs]	24800	26010	24020
	pH	7.15	7.18	7.01
	Densità [g/ml]	1.122	1.125	1.122
	Centrifuga	Stabile	Stabile	Stabile
TiO₂	Viscosità [cPs]	25020	25110	24820
	pH	6.45	6.48	6.38
	Densità [g/ml]	1.121	1.122	1.123
	Centrifuga	Stabile	Stabile	Stabile

Tabella 6: parametri chimico-fisici per le emulsioni dopo essere state conservate per due mesi alla temperatura di 45°C

	Parametro	Base	Filtro Pongamolo	+ Filtro + Pongamolo + Acido Ferulico
Filtri chimici	Viscosità [cPs]	18540	19050	17888
	pH	5.77	5.75	5.48
	Densità [g/ml]	0.989	0.985	0.984
	Centrifuga	Stabile	Stabile	Stabile
ZnO uncoated	Viscosità [cPs]	24870	26420	24870
	pH	7.25	7.27	7.09
	Densità [g/ml]	1.119	1.125	1.121
	Centrifuga	Stabile	Stabile	Stabile
ZnO coated	Viscosità [cPs]	24488	25590	23780
	pH	7.13	7.22	7.05
	Densità [g/ml]	1.121	1.124	1.124
	Centrifuga	Stabile	Stabile	Stabile
TiO₂	Viscosità [cPs]	24878	24788	24222
	pH	6.38	6.43	6.31
	Densità [g/ml]	1.122	1.123	1.121
	Centrifuga	Stabile	Stabile	Stabile

Per quanto riguarda la stabilità delle caratteristiche fisiche del prodotto, si è optato per centrifugare creme e valutare i valori di pH, densità e viscosità appena dopo la preparazione e dopo la conservazione per due mesi alla temperatura di 45°C. Tutti i test eseguiti suggeriscono che i prodotti risultano stabili nel tempo, in quanto non ci sono state grandi variazioni di questi parametri. L'unica fonte di preoccupazione risulta essere il pH in quanto, benchè anch'esso sia rimasto costante, nelle creme con ZnO presenta dei valori non compatibili con la pelle umana. Questo potrebbe essere un problema in quanto un'eventuale correzione del pH potrebbe andare a minare la stabilità dei due prodotti. Le formulazioni contenenti i filtri chimici e il TiO₂ hanno tutte le caratteristiche, pH compreso, nei range ottimali.

3.3.2 SPF in Vitro

Qui di seguito sono riportati i dati riguardanti la foto-protezione dei solari sviluppati.

3.3.2.1 Filtri Chimici

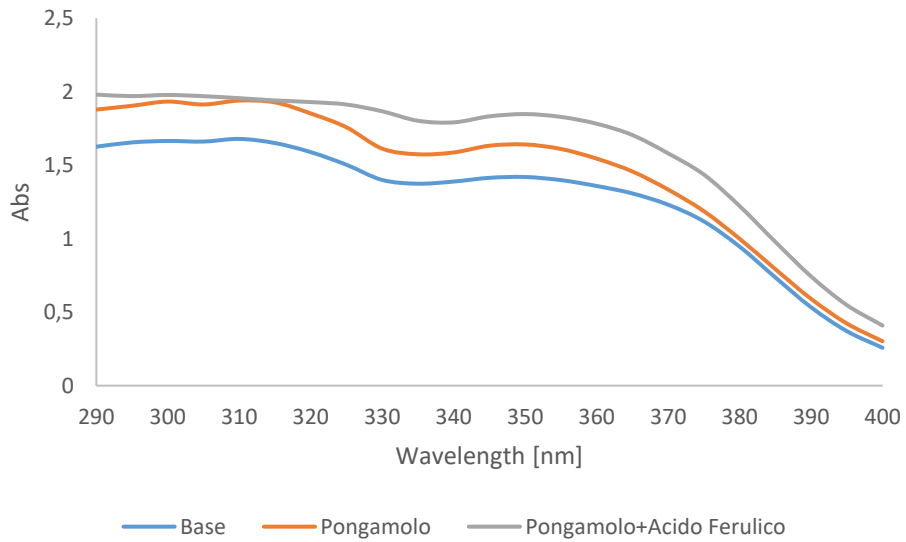


Figura 3-5: grafico rappresentante l'assorbanza delle creme a base di filtri chimici

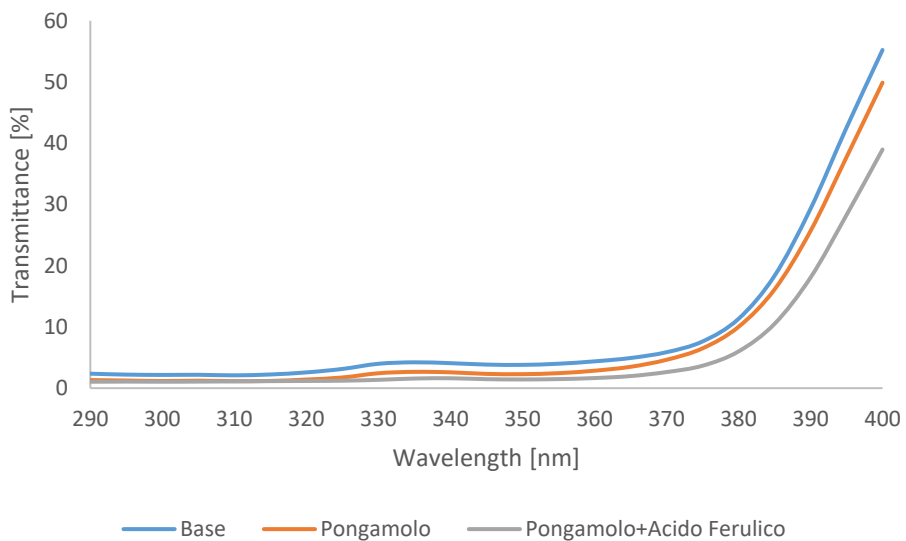


Figura 3-6: grafico rappresentante la trasmittanza delle creme a base di filtri chimici

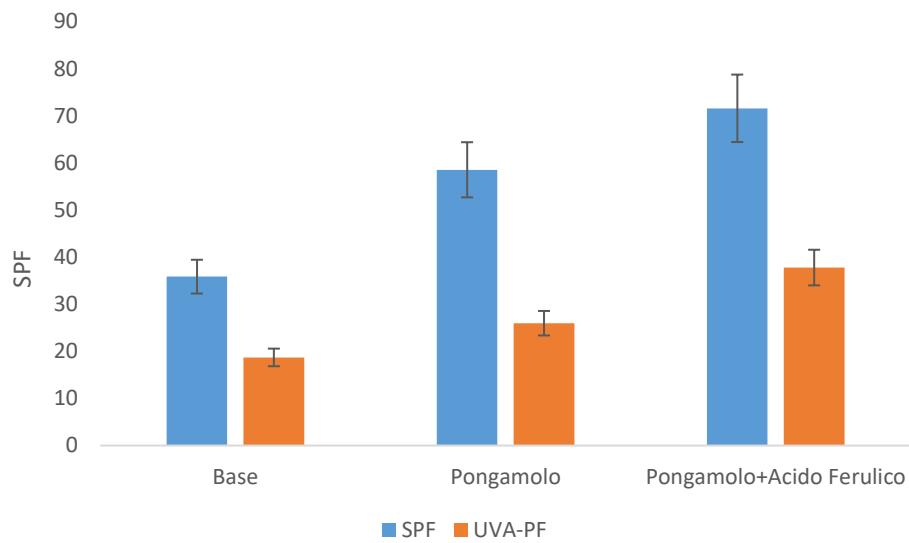


Figura 3-7: istogramma rappresentante i valori di SPF e UVA-PF ottenuti dalle creme con i filtri chimici

È evidente un aumento di SPF dopo applicazione del Pongamolo, anche l'aggiunta di acido ferulico sembra svolgere un ruolo importante nell'aumento del valore di protezione solare. L'aumento di SPF associato all'utilizzo di molecole antiossidanti è un fenomeno in parte già verificato in lavori di ricerca precedenti. L'incremento risulta del 63% per il primo caso e di addirittura il 99% per il secondo.

3.3.2.2 ZnO uncoated

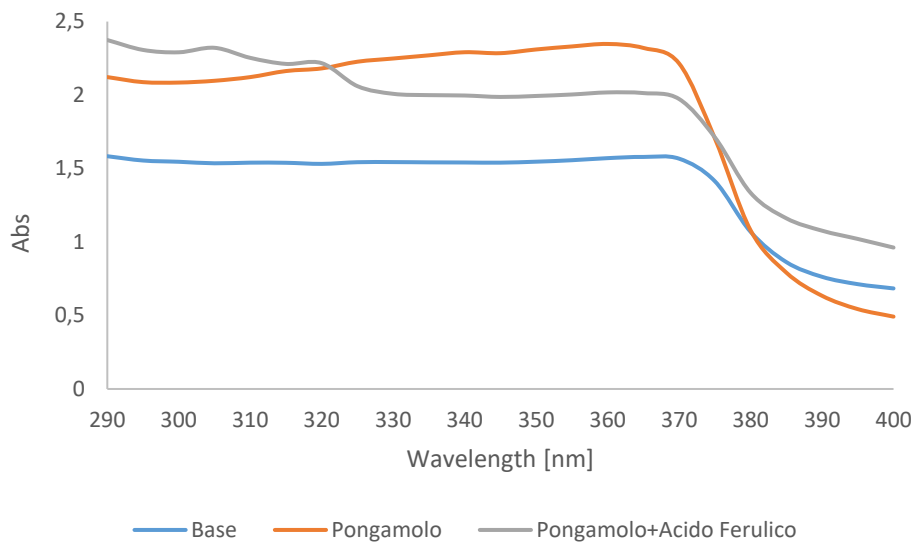


Figura 3-8: grafico rappresentante l'assorbanza delle creme a base di ZnO uncoated

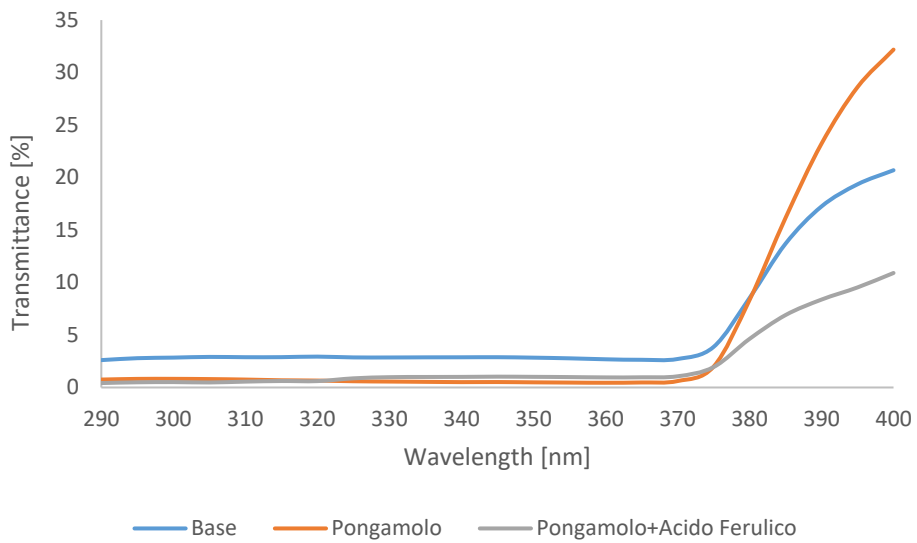


Figura 3-9: grafico rappresentante la trasmittanza delle creme a base di ZnO uncoated

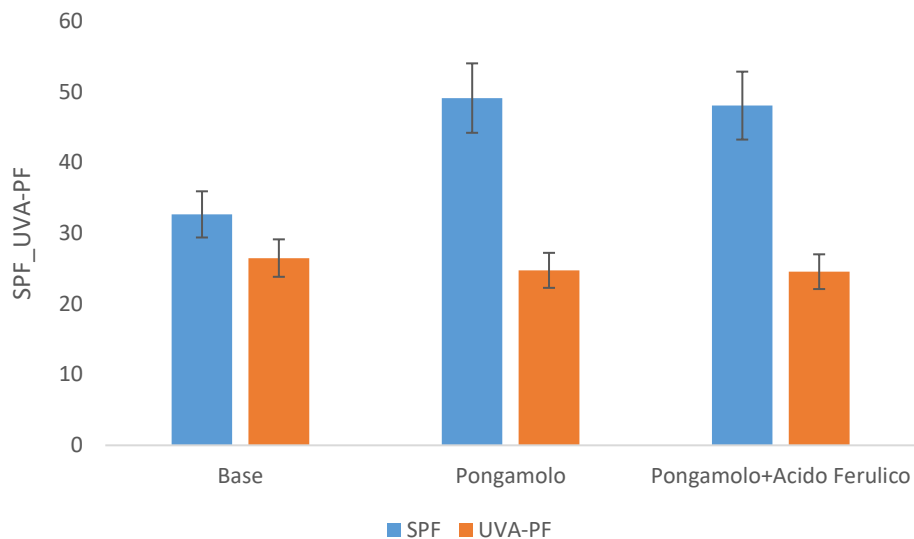


Figura 3-10: istogramma rappresentante i valori di SPF e UVA-PF ottenuti dalle creme con ZnO uncoated

Anche nell'associazione con filtri fisici rivestiti l'incremento di SPF è evidente, anche se in questo caso l'aggiunta di acido ferulico non porta ad un ulteriore surplus. La percentuale di incremento, infatti, si aggira attorno al 49% per il primo caso e 38% per il secondo.

3.3.2.3 ZnO coated

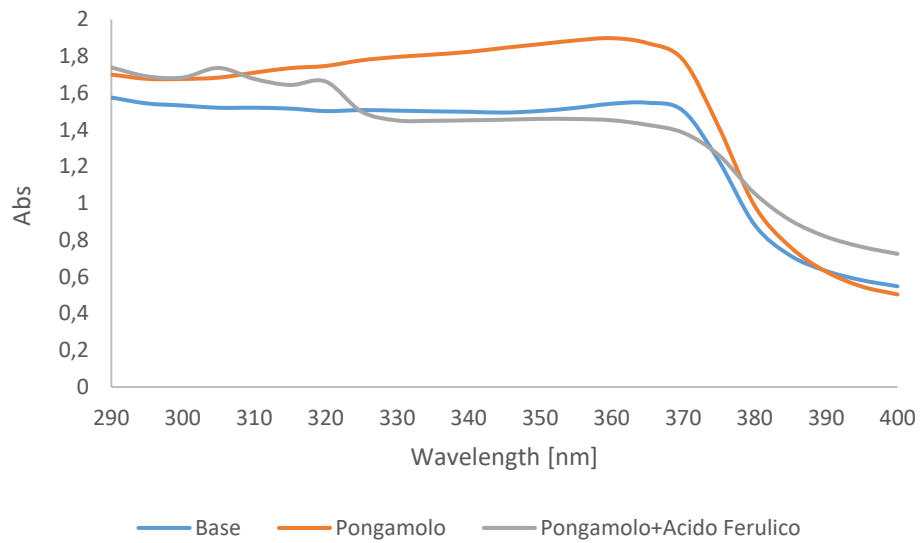


Figura 3-11: grafico rappresentante l'assorbanza delle creme a base di ZnO

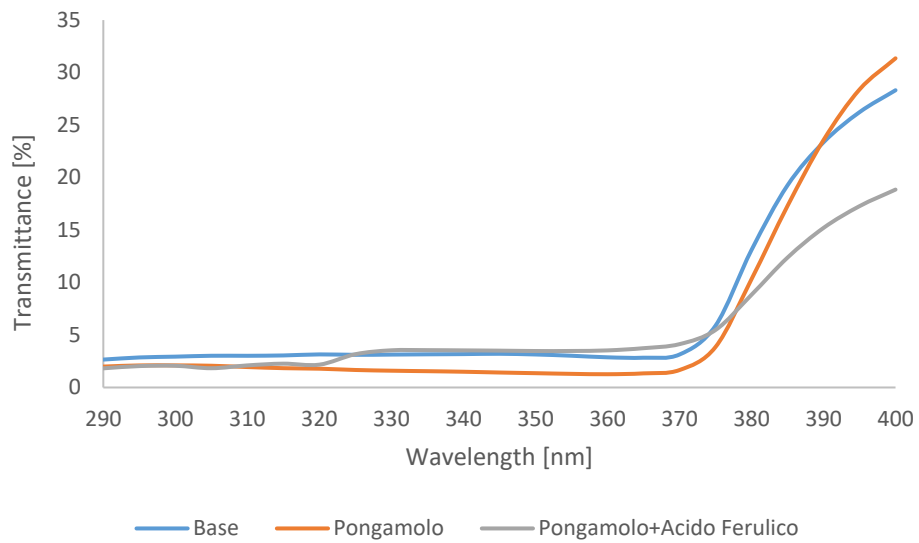


Figura 3-12: grafico rappresentante la trasmittanza delle creme a base di ZnO

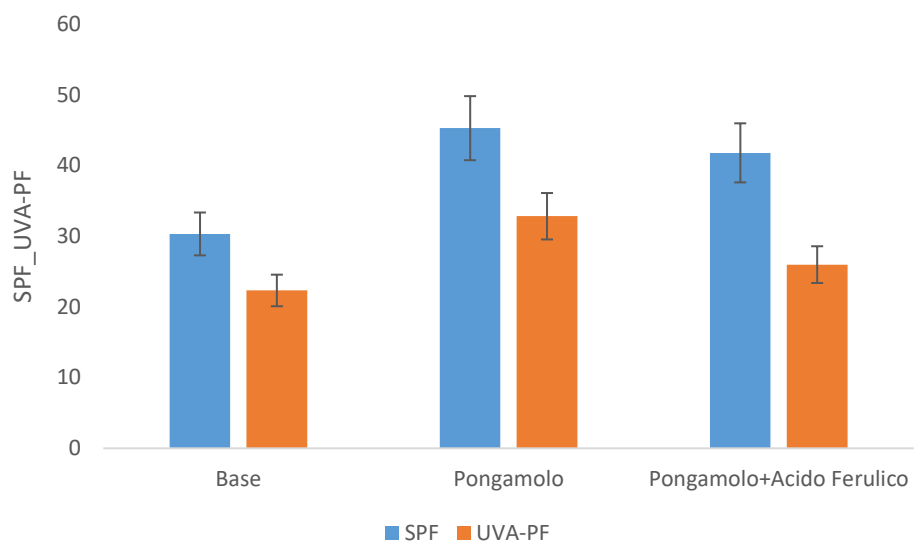


Figura 3-13: istogramma rappresentante i valori di SPF e UVA-PF ottenuti dalle creme con ZnO

I trend per il filtro ZnO non rivestito ripercorrono quelli già osservati per l'ossido di zinco rivestito. L'incremento è del 50% per il Pongamolo e del 47% per Pongamolo con acido ferulico.

3.3.2.4 TiO_2

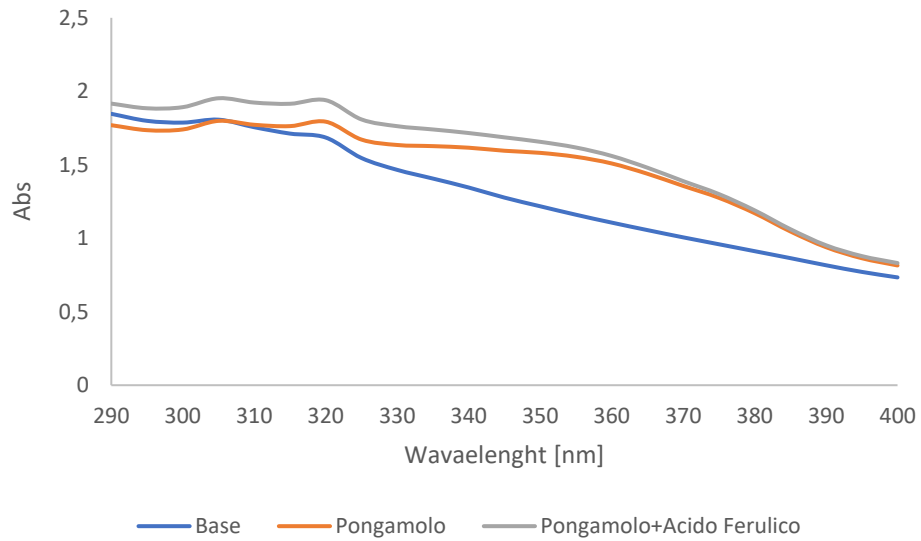


Figura 3-14: grafico rappresentante l'assorbanza delle creme a base di TiO_2

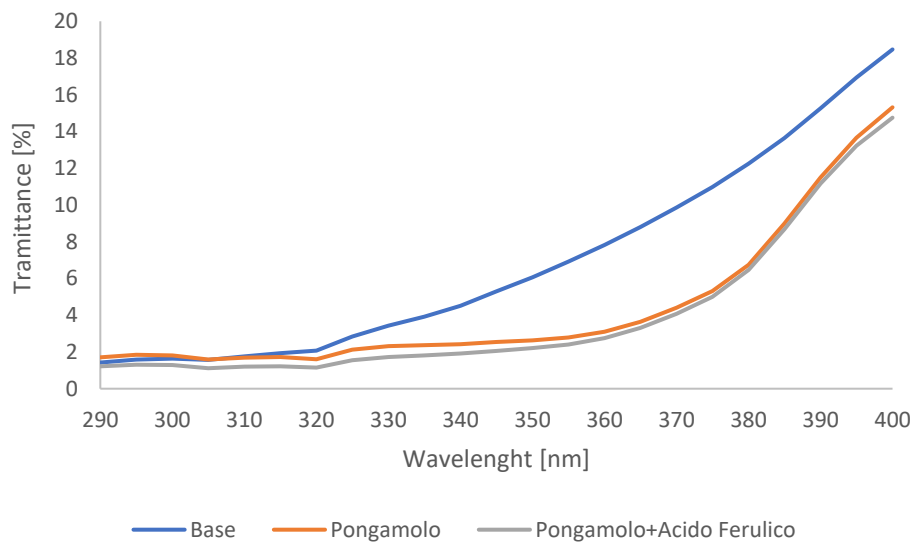


Figura 3-15: grafico rappresentante la trasmittanza delle creme a base di TiO_2

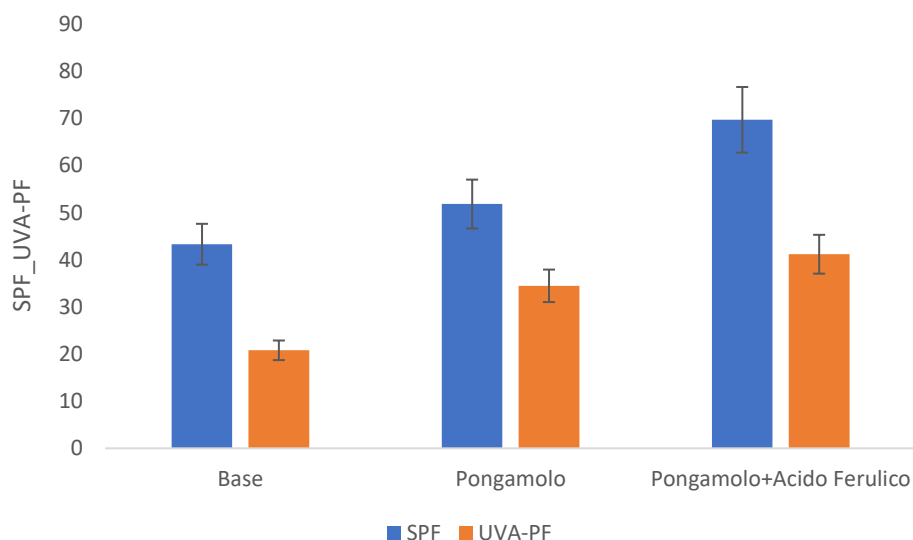


Figura 3-16: istogramma rappresentante i valori di SPF e UVA-PF ottenuti dalle creme con TiO₂

Nel caso del TiO₂, rispetto allo ZnO, si nota un ruolo decisivo dell'aggiunta di acido ferulico. Infatti, nel primo caso l'aumento è del 20% circa mentre nel secondo di oltre il 60%.

Con questo studio abbiamo dimostrato che il *pongamolo* risulta essere un booster efficace per quanto riguarda l'SPF delle creme solari e che l'associazione con l'acido ferulico permette elevare ancora di più questi valori, permettendo così di ridurre la quantità necessaria di filtri UV. Uno dei metodi per cui sembra aumentare l'SPF è attraverso la tautomeria cheto-enolica. Due tautomeri sono degli isomeri di struttura che differiscono l'una dall'altro in base alla posizione di uno o più idrogeni e doppi legami. Un carbonile (aldeide o ketone, è indifferente) presenta un idrogeno legato al carbonio in alfa al gruppo funzionale, l'idrogeno migra e si va a disporre sul carbonile, andando a creare un enolo. Si vengono a creare due molecole simili, ma distinte e diverse tra loro che presentano caratteristiche a sé stanti (Mohammed S J 2020, Smith G J 1998). Nel caso del *pongamolo* abbiamo un β di-ketone che ricorda molto la struttura dell'avobenzone (AB), il più noto filtro chimico per UVA (Gore V K 2008, Z. Y. Wei Z 2023). Poiché non esistono ancora studi che hanno analizzato il meccanismo di azione del *pongamolo* come foto-protettore, possiamo ipotizzare che questo agisca allo stesso modo dell'avobenzone. Oltre alla somiglianza di struttura, le due molecole hanno il picco di assorbimento simile: a 350 nm per il *pongamolo* mentre a 357 nm per l'avobenzone. Numerosi studi, come quello condotto da Berenbeim J A (2020) e quello di Z. Y. Wei Z (2023) riportano la forma enolica dell'AB come la responsabile dell'assorbimento di quanti di energia. Ecco, quindi, che AB assorbe gli UVA e passa dallo stato fondamentale di enolo singoletto allo stato eccitato di ketone, la quale può presentarsi in forma sia di singoletto che di tripletto eccitato. Da qui, la molecola non riesce

a restituire all'ambiente l'energia assorbita e tende a scomporsi in diversi frammenti in seguito a irradiazione. In presenza di antiossidanti o quenchers è noto che AB riesce a ritornare nella forma enolica, mediante trasferimento di energia ad una molecola eccittrice. Continuando con l'ipotesi che *pongamolo* e avobenzone abbiamo meccanismi d'azione simili, è importante citare il lavoro di Chatelain E (2001) in cui si mette in evidenza come il Tinosorb S abbia un comportamento sinergico con AB, andando a stabilizzare quest'ultimo. Ciò permetterebbe di spiegare l'evidente sinergia tra *pongamolo* e Tinosorb S e il notevole aumento di SPF nella crema contenente i filtri chimici.

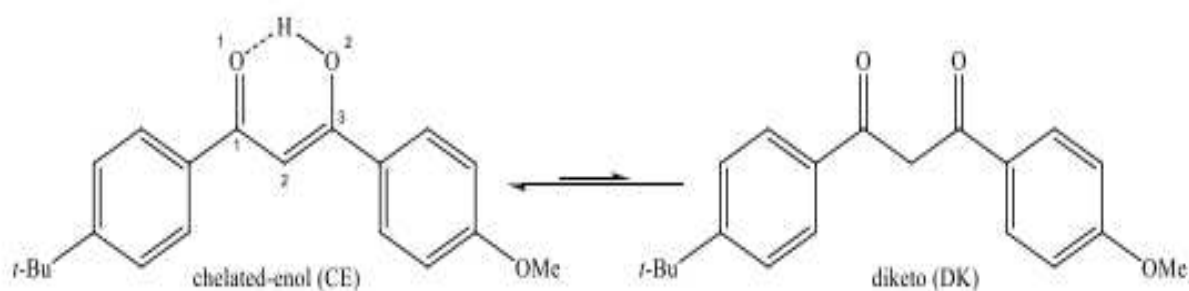


Figura 3-17: tautomeria keto-enolica dell'avobenzone

3.3.3 Analisi DPPH

Per valutare l'attività antiossidante si è usato il saggio del DPPH. In questo caso i comportamenti delle creme risultano essere più omogenei tra loro, in quanto l'associazione pongamia e acido ferulico hanno la maggiore efficacia come antiossidanti, anche se ciò è dovuto al fatto che l'acido ferulico è di per sé un antiossidante. Il *pongamolo* causa, comunque, una riduzione di radicali nella cuvetta, come possiamo vedere in tutti i grafici. Il caso dell'ossido di zinco coated risulta essere di particolare interesse perché qui il *pongamolo* da solo risulta avere un potere antiossidante maggiore rispetto all'associazione con l'acido ferulico. Infatti, nel primo caso abbiamo una riduzione di radicali di 6 μM mentre nel secondo caso di 5 μM . Al contrario, nella soluzione con i filtri chimici non sembra avere alcuna attività antiossidante, infatti, in 30 minuti, soltanto 1.6 μM sono state neutralizzate. Le misurazioni sono state effettuate partendo da 2.5mL di soluzione di DPPH 61 μM , associandole a $t=0$ e a questa sono stati poi aggiunti 0.2mL di soluzione direttamente nella cuvetta di quarzo. In seguito, si è misurato l'assorbanza a $t=1-5-15-30$ min per valutare la cinetica della reazione. Come si può notare nelle figure dalla 11 alla 14, tutte le soluzioni tendono a raggiungere un plateau verso i 30 minuti.

3.3.3.1 Filtri Chimici

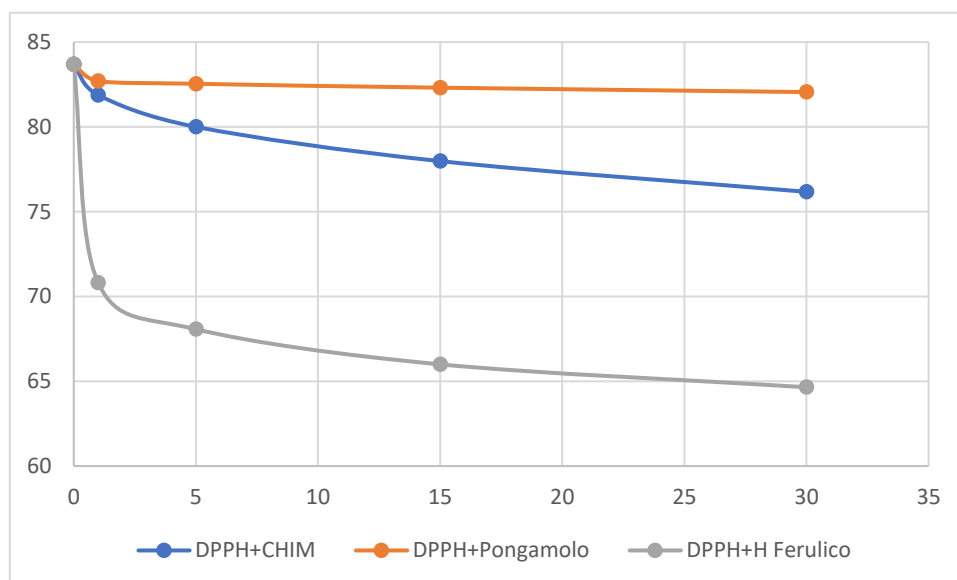


Figura 3-18: grafico rappresentante la cinetica di reazione del DPPH in presenza dei filtri chimici

3.3.3.2 ZnO uncoated

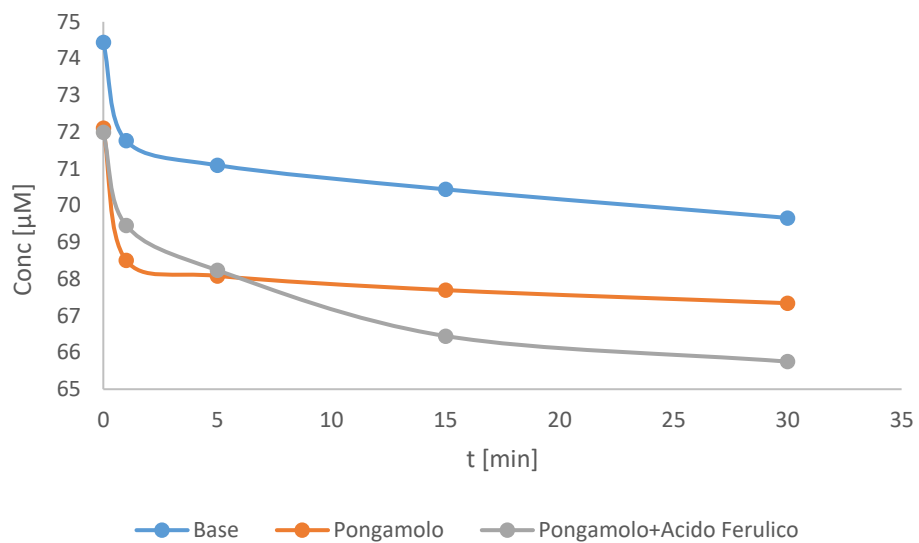


Figura 3-19: grafico rappresentante la cinetica di reazione del DPPH in presenza del ZnO uncoated

3.3.3.3 ZnO coated

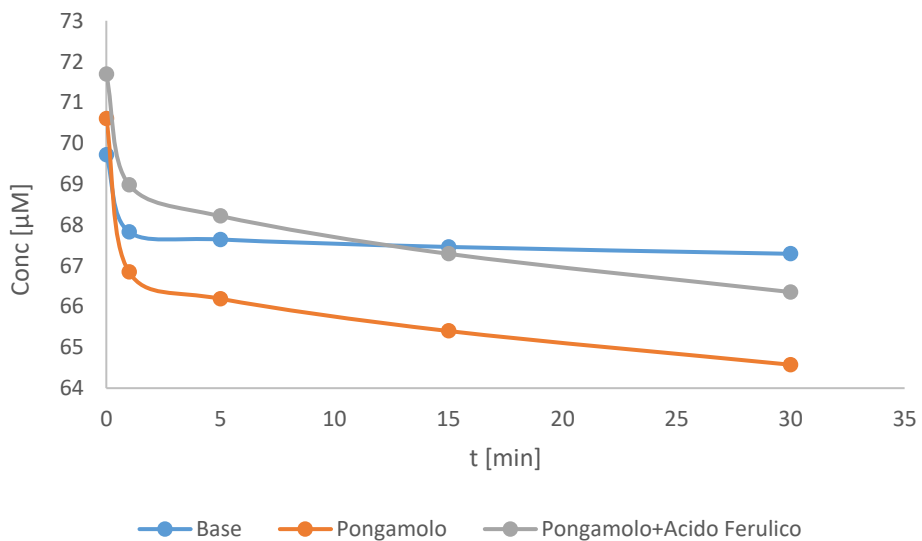


Figura 3-20: grafico rappresentante la cinetica di reazione del DPPH in presenza del ZnO coated

3.3.3.4 TiO₂

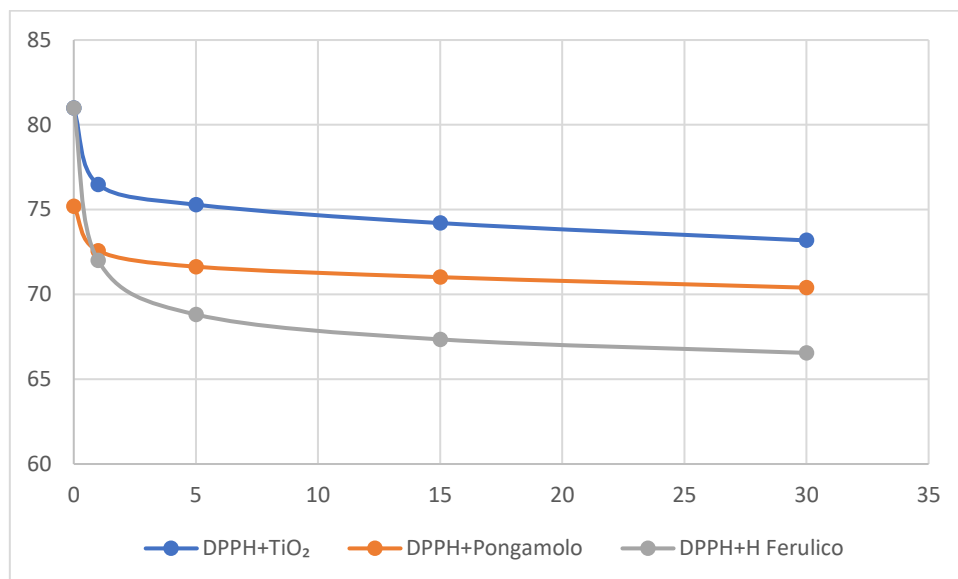


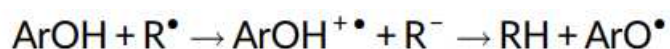
Figura 3-21: grafico rappresentante la cinetica di reazione del DPPH in presenza del TiO₂

Gli esperimenti condotti con il DPPH hanno permesso di capire che il *pongamolo* presenta una scarsa attività antiossidante e che è necessaria l'aggiunta di una molecola con tale funzione per avere dei risultati degni di nota. Tuttavia, il *pongamolo* possiede tre meccanismi d'azione diversi per quanto riguarda la cessione di un elettrone, che sono:

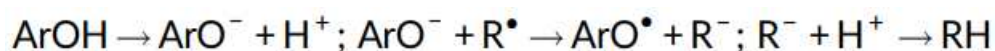
1. Trasferimento di un atomo di idrogeno (HAT): un protone viene ceduto dal gruppo ossidrilico dell'antiossidante (ArOH) al radicale in un solo passaggio, seguendo la formula



2. Trasferimento di un elettrone seguito da un protone (SET-PT): la molecola antiossidante prima cede un elettrone, andando a creare un catione radicale (ArOH^{+•}) seguito dalla sua successiva deprotonazione



3. Trasferimento di un protone seguito dalla perdita di un elettrone (SPLET): la reazione è simile al caso precedente ma i due step sono invertiti, prima c'è il trasferimento di un protone e poi quella di un elettrone al radicale



Come riportato nei lavori di Wang G (2015), Xue Y (2018) e Thong N M (2016), negli ambienti polari SPLET è favorito mentre HAT risulta essere dominante in ambienti apolari o gassosi. Poiché è necessario un idrossile in grado di cedere un protone, il *pongamolo* deve trovarsi nella forma enolica per avere proprietà antiossidanti. Ciò potrebbe spiegare le modeste proprietà antiossidanti della molecola, in quanto tutta la frazione ketonica risulta essere inattiva. Una volta che viene convertito nella forma attiva, questa risulta essere la forma che possiede l'attività foto-protettiva e, siccome noi apportiamo un eccesso di fotoni alla molecola, l'attività antiossidante viene messa in secondo piano.

4 Conclusioni

In un'epoca di sempre crescente sensibilità per la salute del nostro pianeta, anche i prodotti solari sono chiamati a compiere un passo verso la sicurezza non solo umana ma anche ambientale. Questi rappresentano una particolare categoria di cosmetici in cui i concetti di sicurezza ed efficacia si sovrappongono e l'una rappresenta un requisito fondamentale per l'altra.

Dunque, la sfida è quella di sviluppare un prodotto che permetta di coniugare sicurezza e salvaguardia dell'impatto ambientale: il fenomeno dello sbiancamento dei coralli rappresenta una problematica di sempre maggiore rilevanza, dal quale nemmeno i prodotti solari possono ritenersi esenti. Infatti, circa il 25% delle creme solari applicate vengono rilasciate in acqua in seguito ad applicazione topica per un totale stimato di 4000-6000 tonnellate all'anno di filtri rilasciati in acque marine su scala mondiale. Di tale fenomeno se ne sono accorti dapprima i Paesi direttamente coinvolti avendo nel loro territorio ampie fasce di barriera coralline, come Palau e Hawaii, i quali sono giunti a vietare filtri chimici quali oxybenzone e octinoxate. Infine, stanno sorgendo perplessità a riguardo della penetrazione di alcune molecole filtranti nel sistema linfatico, in particolar modo se queste sono di dimensioni nanometriche (Smijs T G 2011, Schneider S L 2019, Tortini G 2022, Jesus A 2022, BHATTACHARJEE D 2021).

Il lavoro di tesi condotto si è focalizzato sull'importanza delle scelte formulative finalizzate alla diminuzione dell'impiego di filtri UV oltre allo sviluppo di prodotti con profilo di sicurezza congruo sia a livello ambientale che a livello tossicologico. L'impiego di *Pongamolo* come booster sembra rispondere efficacemente a queste richieste consentendo il raggiungimento di elevati fattori di protezione con limitato impiego di molecole filtranti. Si è quindi proceduto alla preparazione di emulsioni cosmetiche contenenti sia filtri chimici che filtri fisici e valutando l'efficacia di quest'ultimo al 0.25%. Tale valore è stato dedotto da lavori precedenti che hanno consentito di individuare una percentuale minima di impiego per ottenere un effetto boosterizzante. Dagli studi effettuati si è notato che l'incremento minimo è stato del 20% con punte di addirittura oltre il 90%. Queste evidenze aprono la possibilità a strategie formulative completamente nuove dove elevati fattori di protezione solare possono essere raggiunti con basse quantità di molecole filtranti.

Si è voluto incrementare lo studio andando a valutare il potere antiossidante dei nuovi sistemi creati. I risultati hanno confermato quanto intuibile: ZnO e TiO₂, essendo fotocatalizzatori, possono interagire con acido ferulico diminuendone la capacità antiossidante. Il test applicato ai filtri chimici,

invece, ha mostrato una blanda attività sia del Pongamolo di per sé, sia in associazione con acido ferulico.

5 Bibliografia

- A, Levine. «Reducing the prevalence of chemical UV filters from sunscreen in aquatic environments: Regulatory, public awareness, and other considerations.» *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2021: 1-7.
- A, Shaath N. «Ultraviolet filters.» *The Royal Society of Chemistry and Owner Societies*, n. 9 (2010): 464–469.
- Aeri V, Narayana D.B.A., Singh D. «Chapter 6.15 - Pongamia pinnata.» In *Powdered Crude Drug Microscopy of Leaves and Barks*, di Narayana D.B.A., Singh D Aeri V, 187-190. Amsterdam: Susan Dennis, 2020.
- Al Muqarrabun L.M.R., Ahmat N, Ruzaina S.A.S., Ismail N.H., Ismail I. «Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of Pongamia pinnata (L.) Pierre: A review.» *Journal of Ethnopharmacology*, n. 150 (2013): 395-420.
- Armstrong B K, Kricker A. «The epidemiology of UV induced skin cancer.» *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, n. 63 (2001): 8-18.
- Badole S L, Bodhankar S L. «Pongamia pinnata: Treatment of Diabetes.» In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*, di Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy, 207-213. Pune, India: Elsevier Inc, 2013.
- Bendova H, Akerman J, Krejci A, Kubac L, Jirova, Kejlova K, Kolarova H, Brabec M, Maly M. «In vitro approaches to evaluation of Sun Protection Factor.» *Toxicology in Vitro*, n. 21 (2007): 1268–1275.
- Berenbeim J A, Wong N G K, Cockett M C R, Berden G, Oomens J, Rijs A M, Dessent C E H. «Unravelling the Keto–Enol Tautomer Dependent Photochemistry.» *The Journal of Physical Chemistry*, n. 124 (2020): 2919-2930.
- BHATTACHARJEE D, PREETHI S, PATIL A B, JAIN V. «A comparison of Natural and Synthetic Sunscreen Agents: A Review.» *International Journal of Pharmaceutical Research*, 2021: 3494-3505.

- Chatelain E, Gabard B. «Photostabilization of Butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and Ethylhexyl methoxycinnamate by Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a New UV Broadband Filter.» In *Photochemistry and Photobiology*, di Gabard B Chatelain E, 401-406. American Society for Photobiology, 2001.
- D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. «UV Radiation and the Skin.» *International Journal of Molecular Sciences*, n. 14 (2013): 12222-12248.
- Degani E, Prasad M V R , Paradkar A, Pena R, Soltangheisi A, Ullah I, Warr B, Tibbett M. «A critical review of Pongamia pinnata multiple applications: From land remediation and carbon sequestration to socioeconomic benefits.» *Journal of Environmental Management*, 2022: 1-20.
- dermatest. *dermatest.* s.d. <https://www.dermatest.com/> (consultato il giorno luglio 22, 2023).
- DIFFEY B L, ROBSON J. «A new substrate to measure sunscreen protection factor throughout the ultraviolet spectru.» *JOURNAL OF THE SOCIETY OF COSMETIC CHEMISTS*, 1989: 127-133.
- Downs C A, Kramarsky-Winter E, Segal R, Fauth J, Knutson S, Bronstein O, Ciner F R, Jeger R, Lichtenfeld Y, Woodley C M, Pennington P, Cadenas K, Kushmaro A, Loya Y. «Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV Filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on Coral Planulae and Cultured Primary Cells and Its Environmental Contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands.» *Arch Environ Contam Toxicol*, n. 70 (2016): 265–288.
- Fisher G J, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees J J. «Mechanisms of photoaging and chronological skin aging.» *Archives of Dermatological Research*, 2002: 1462-1470.
- Geoffrey K, Mwangi A N, Maru S M. «Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations.» *Saudi Pharmaceutical Journal*, n. 27 (2019): 1009-1018.
- Gore V K, Satyamoorthy P. «DETERMINATION OF PONGAMOL AND KARANJIN IN KARANJA OIL BY REVERSE PHASE HPLC.» *Analytical Letters*, n. 33 (2008): 337-346.

- He T, Po Tsui M M, Tan C J, Ng K Y, Guo F W, Wang L H, Chen T H, Fan T Y, Sing Lam P K, Murphy M B. «Comparative toxicities of four benzophenone ultraviolet filters to two lifestages of two coral species.» *Science of the Total Environment*, n. 651 (2019): 2391-2399.
- Jahan S, Mahmud Md H, Khan Z, Alam A, Khalil A A, Rauf A, Tareq A M, Nainu F, Tareq S M, Emran T B, Khan M, Khan I N, Wilairatana P, Mubarak M S. «Health promoting benefits of pongamol: An overview.» *Biomedicine & Pharmacotherapy*, n. 142 (2021): 1-8.
- Jesus A, Sousa E, Cruz M T, Cidade H, Sousa Lobo J M, Almeida I F. «UV Filters: Challenges and Prospects.» *MDPI Pharmaceuticals*, n. 15 (2022): 1-26.
- KELLEY K A, LASKAR P A, EWING G D, DROMGOOLE S H, LICHTIN J L, SAKR A A. «In vitro sun protection factor evaluation of sunscreen produc.» *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* , 1993: 139-151.
- L, Eckert R, Yaffe M B, Crish J F, Murthy S, Rorke E A, e Welter J F. «Involucrin - Structure and Role in Envelope Assembly.» *THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY*, 1993: 613-617.
- Lai-Cheong J E, McGrath J A. «Structure and function of skin, hair and nails.» *MEDICINE*, n. 49 (2021): 337-342.
- Lim H W, Draelos Z D. *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection*. New York, Londra: Lim H W, Draelos Z D, 2009.
- Marks J G JR, Miller J J. *Principles of Dermatology*. VI. Hershey, USA: Elsevier Inc, 2019.
- Marone P A, Olson J, Matulka R, Bauter M, Astwood J D. «Safety and toxicologic evaluation of Edible Pongamia Oil: A novel food ingredient.» *Food and Chemical Toxicology*, n. 166 (2022): 1-11.
- Marriboina S, Sharma K, Sengupta D, Yadavalli A D, Sharma R P, Attipalli R R. «Evaluation of high salinity tolerance in Pongamia pinnata (L.) Pierre by a systematic analysis of hormone-metabolic network.» *Physiologia Plantarum*, 2021: 1-21.
- Matts P J, Alard V, Brown M W, Ferrero L, Gers-Barlag H, Issachar N, Moyal D, Wolber R. «The COLIPA in vitro UVA method: a standard and.» 2010: 35-46.

- Matts P J, Alard V, Brown M W, Ferrero L, Gers-Barlag H, Issachar N, Moyal D, Wolber R. «The COLIPA in vitro UVA method: a standard and reproducible measure of sunscreen UVA protection.» *International Journal of Cosmetic Science*, n. 32 (2010): 35-46.
- Moeller M, Pawlowski S, Petersen-Thiery, Miller I B, Nietzer S, Heisel-Sure Y, Kellermann M Y, Schupp P J. «Challenges in Current Coral Reef Protection - Possible Impact of UV Filters used in sunscreens, a Critical Review.» *Frontiers in Marine Science*, n. 8 (2021): 1-16.
- Mohammed S J, Salih A K, Rashid M A M, Omer K M, Abdalkarim K A. «Synthesis, Spectroscopic Studies and Keto-Enol Tautomerism of Novel 1,3,4-Thiadiazole Derivative Containing 3-Mercaptobutan-2-one and Quinazolin-4-one Moieties.» *MDPI Molecules*, n. 25 (2020): 1-15.
- Padera F. «PerkinElmer for the better.» *PerkinElmer*. 2013-2014. https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/app_011499_01_sunscreen_testing_according_to_colipa_2011_fda_final_rule_2011_using_uv_vis_lambda_spectrophotometers.pdf (consultato il giorno luglio 4, 2023).
- Pilkington S M, Bulfone-Paus S, Griffiths C E M, Watson R E B. «Inflammaging and the Skin.» *Journal of Investigative Dermatology*, n. 141 (2021): 1087-1095.
- Popp L, Segatori L. «Zinc Oxide Particles Induce Activation of the Lysosome–Autophagy.» *American Chemical Society Omega*, 2019: 573-581.
- Radice M, Manfredini S, Ziosi P, Dissette V, Buso P, Fallacara A, Vertuani S. «Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review.» *Fitoterapia*, n. 114 (2016): 144-162.
- Randazzo S, Caronia A, Floriano M A. «Diossido di titanio e alcune sue applicazioni. Spunti didattici.» *Università degli Studi di Palermo*, 2016: 33-42.
- RANGASWAMI S, SESHADRI T R. «Chemistry of Pongamol. Part II.» 1954: 1871-1873.
- RANGASWAMI S, SESHADRI T R. «HEMISTRY OF PONGAMOL. PART I .» 1942: 417-423.

- Rekha M J, Bettadaiah B K, Kanya T C S, Govindaraju K. «A feasible method for isolation of pongamol from karanja (Pongamia pinnata) seed and its anti-inflammatory activity.» *Industrial Crops & Products*, n. 154 (2020): 1-11.
- Sakamoto K, Lochhead R Y, Maibeah H I, Yamashita Y. *COSMETIC SCIENCE AND TECHNOLOGY: THEORETICAL PRINCIPLES AND APPLICATIONS*. Amsterdam: Elsevier Inc, 2017.
- Sambandan D R, Ratner D. «Sunscreens: An overview and update.» *American Academy of Dermatology*, 2011: 748-758.
- Sangwan S, Rao D V, Sharma R A. «A Review on Pongamia Pinnata (L.) Pierre: A Great Versatile Leguminous Plant.» *Nature and Science*, 2010: 130-139.
- Santosa B A.M.C, Da Silva A.C.P, Bello M L, Goncalves A S, Gouvea T A, Rodrigues R F, Cabral L M, Rodrigues C R. «Molecular modeling for the investigation of UV absorbers for sunscreens: Triazine and benzotriazole derivatives.» *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, n. 356 (2018): 219-229.
- Schneider S L, Lim H W. «A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide.» *Photodermatology Photoimmunology Photomedicine*, n. 35 (2019): 442–446.
- Singha K T, Sreeharsha R V, Mariboina S, Reddy A R. «Dynamics of metabolites and key regulatory proteins in the developing seeds of Pongamia pinnata, a potential biofuel tree species.» *Industrial Crops & Products*, n. 140 (2019): 1-11.
- Smijs T G, Pavel S. «Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness.» *Nanotechnology, Science and Applications*, n. 4 (2011): 95–112.
- Smith G J, Markham K R. «Tautomerism of $\bar{\nu}$ -avonol glucosides: relevance to plant UV protection and $\bar{\nu}$ ower colour.» *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, n. 118 (1998): 99-105.
- Stien D, Clergeaud F, Rodrigues A M S, Lebaron K, Pillot R, Romans P, Fagervold S, Lebaron P. «Metabolomics Reveal That Octocrylene Accumulates in Pocillopora damicornis Tissues as Fatty Acid Conjugates and Triggers Coral Cell Mitochondrial Dysfunction.» *analytical chemistry*, n. 91 (2019): 990-995.

- Stien D, Suzuki M, Rodrigues A M S, Yvin M, Clergeaud F, Thorel E, Lebaron P. «A unique approach to monitor stress in coral exposed to emerging pollutants.» *Scientific Reports*, n. 10 (2020): 1-11.
- Suyambulingama A, Nair S, Chellapandiana K. «Synthesis, spectral characterization of novel chalcones based oxazines derivatives and screening of their antimicrobial and antioxidant activity.» *Journal of Molecular Structure*, n. 1268 (2000): 1-6.
- Świątczak D, Belica-Pacha S, Zawisza A, Kisielewska A, Światły-Błaszkiwicz A, Kupcewicz B, Bartosewicz B, Jankiewicz B J, Małecka M. «Comparative study of titanium dioxide to improve the.» *International Journal of Cosmetic Science*, n. 45 (2022): 315-328.
- Thong N M, Dao D Q, Ngo T C, Huyen T L, Nam P C. «Antioxidant activities of [60]fullerene derivatives from chalcone, flavone and flavanone: A ONIOM approach via H-atom and electron transfer mechanism.» *Chemical Physics Letters*, n. 652 (2016): 56-61.
- Tortini G, Ziosi P, Cesa E, Molesini S, Baldini E, De Lucia D, Rossi C, Durini E, Vertuani S, Manfredini S. «Criticisms in the Development of High-Protection and Broad-Spectrum “Natural/Organic” Certifiable Sunscreen.» *MDPI Cosmetics*, 2022: 1-18.
- Tovar-Sanchez I A, Sparaventi E, Gaudron A, Rodriguez-Romero A. «A new approach for the determination of sunscreen levels in seawater by ultraviolet absorption spectrophotometry.» *PLOS ONE*, 2020: 1-10.
- Wang G, Xue Y, An L, Zheng Y, Dou Y, Zhang L, Liu Y. «Theoretical study on the structural and antioxidant properties of some.» In *Food Chemistry*, di Y. Liu Y. Xue, 89-97. Xuzhou, Jiangsu, 2015.
- Wang S Q, Lim H W. *Principles and Practice of Photoprotection*. Londra: Wang S Q, Lim H W, 2016.
- Wang S Q, Stanfield J W, Osterwalder U. «In vitro assessments of UVA protection by popular.» 2008.
- Wang S Q, Stanfield J W, Osterwalder U. «In vitro assessments of UVA protection by popular sunscreens available in the United States.» *American Academy of Dermatology*, n. 6 (2008): 934-92.

Wei Z, Zhang Y, Zhang X. «Controlled reversible single-molecule white-light emission from keto-enol interconversion of β -diketone dyes.» In *Dyes and Pigments*, di X. Zhang, 1-7. Tianjin: School of Chemical Engineering and Technology, 2023.

Wei Z, Zhang Y, Zhang X. «Controlled reversible single-molecule white-light emission from keto-enol interconversion of β -diketone dyes.» *Dyes and Pigments*, n. 216 (2023): 1-7.

Xue Y, Liu Y, Zhang L, Wang H, Luo Q, Chen R, Liu Y, Li Y. «Antioxidant and spectral properties of chalcones and.» *International Journal of Quantum Chemistry*, 2018: 1-13.

Zhong Q-Y, Lin B, Chen Y-T, Huang Y-P, Feng W-P, Wu Y, Long G-H, Zou Y-N, Liu Y, Lin B-Q, Sang N-L, Zhan J Y-X. «Gender differences in UV-induced skin inflammation, skin carcinogenesis and systemic damage.» Cap. 81 in *Environmental Toxicology and Pharmacology*, di J.Y.-X. Zhan, 1-10. Guangzhou: Aston University, 2021.