

Kosmetica

Solari

OLTRE LA PROTEZIONE UV

I filtri solari sono un aspetto importante della fotoprotezione, la loro efficacia nel ridurre la fotocarcinogenesi e il fotoinvecchiamento è ampiamente documentata. Nuove tecnologie e filtri stanno migliorando l'estetica e l'efficacia dei prodotti moderni



Secondo Euromonitor International, nel 2017, il mercato dei prodotti per la protezione solare è stato valutato circa 9,8 miliardi di dollari, questo grazie all'evoluzione delle tendenze. I consumatori desiderano sempre più prodotti per proteggersi dal sole che vadano oltre la semplice protezione, vi è una crescente necessità di ingredienti per creare prodotti multifunzionali, per la protezione dai raggi UV, dall'inquinamento e contro l'invecchiamento, semplificando l'integrazione della protezione dalla luce solare nella routine quotidiana. Oltre alla consapevolezza della necessità di proteggersi contro l'esposizione al sole, altri driver di categoria includono nuovi formati, ingredienti e metodologie di test. L'aumento della bellezza inclusiva si è spesso concentrato sul trucco e sulla cura dei capelli, ma ci sono anche implicazioni significative nel settore della protezione solare. La richiesta di prodotti di bellezza efficaci, costruiti intorno ai bisogni del consumatore, ha generato una nuova ondata di innovazioni. Per esempio solari creati per persone di colore, con toni della pelle dal beige al cioccolato fondente. È il caso di UnSun, studiato e formulato appositamente per non lasciare il classico film bianco dopo l'applicazione.

Euromonitor International, ha stimato che le vendite di prodotti solari nell'Europa dell'Est sono aumentate dell'8,1% nel corso del 2017 a 281,5 milioni di dollari. La Russia è stata il principale motore di crescita, con le vendite in ripresa, da una leggera flessione nel 2016, a crescere del 14,4% nel 2017. Le vendite di prodotti in Europa occidentale hanno registrato nel 2017 un aumento del 2,2% per un controvalore di oltre 2,8 miliardi di dollari. La Spagna ha guidato la carica, con un aumento delle vendite del 6,6%, seguita dalla Germania, in rialzo del 4,4% e dalla Francia, in crescita del 3,2% su base annua. Solo il Regno Unito ha registrato un calo delle vendite dello 0,8%, anche se questo è stato un netto miglioramento rispetto al calo precedente del 9,9%, nel 2016. I lanci dei prodotti europei si sono contraddistinti da una narrativa dermocosmetica più forte, con una percentuale più elevata di prodotti che promuovono affermazioni «dermatologicamente testate» e «per pelli sensibili», ciò è dovuto all'aumento delle richieste di queste esigenze da parte dei consumatori europei tra il 2014 e il 2017. Gli ingredienti per la protezione solare si trovano in molti tipi di prodotti per la cura della pelle. Sviluppati inizialmente per prevenire le

scottature solari, i filtri solari si sono evoluti per proteggersi da altri effetti dannosi delle radiazioni ultraviolette (UVR). L'UVB (280-320 nm) induce tipicamente eritema e danno diretto al DNA attraverso la formazione del dimero di pirimidina, mentre l'UVA (320-400 nm) è associato all'abbronzatura e al photoaging. Lo spettro UVA genera anche eccesso di specie reattive dell'ossigeno che danneggiano indirettamente il DNA. Anche se le cellule della pelle possiedono antiossidanti, enzimi di riparazione del DNA e segnalazione dello stress per minimizzare tali danni, un'esposizione UV eccessiva può ancora portare a mutazioni e instabilità genetica. È stato anche dimostrato che l'esposizione ai raggi UVA aumenta il numero di cellule infiammatorie del derma, mentre diminuisce l'attività cellulare di antigeni epidermici umani e il numero di cellule di Langerhan. Questa immunosoppressione indotta da UV svolge probabilmente un ruolo indiretto e permissivo nella fotocarcinogenesi, mentre l'esposizione solare a lungo termine ha probabilmente un ruolo più diretto nello sviluppo del cancro della pelle non melanoma (NMSC).

Della radiazione solare che raggiunge la superficie terrestre, il 95% è luce visibile o infrarosso, frequenze non dannose per la pelle, i problemi di salute sono causati dal 5% di radiazioni «ultraviolette» (UV).

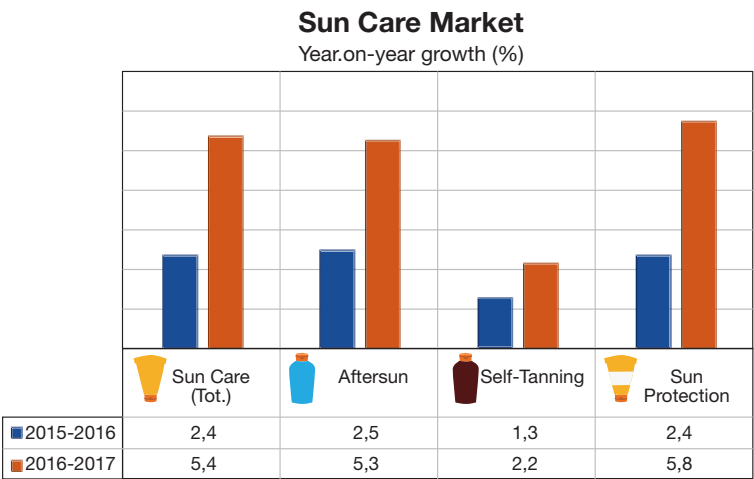
Recenti ricerche hanno posto maggiormente l'accento sulla protezione dai raggi UVA. Nonostante la protezione UVB e l'alto SPF siano indispensabili, la protezione UVA è ora riconosciuta come ugualmente essenziale ed è diventata un obiettivo per una maggiore efficacia della protezione solare.

EFFICACIA

I filtri solari ideali assicurano una protezione uniforme attraverso la gamma di raggi ultravioletti A e B, mantenendo le caratteristiche sensoriali e tattili che migliorano l'esperienza dell'utente. L'efficacia della protezione solare dipende dal tipo di filtro ultravioletto (organico o inorganico), dalla fotostabilità e dall'aggiunta di agenti che potenziano il fattore di protezione solare.

Valutazione della protezione

La dose minima eritematosa (MED) di UVR è la dose minima che produce scottature solari. SPF è definito come il rapporto tra MED della pelle protetta e non protetta. In teoria, l'applicazione di un prodotto con SPF5 fornisce una protezione contro le scottature cinque volte più a lungo della pelle non protetta. SPF è una misura dei filtri solari, SPF15 blocca circa il 94% dei raggi UVB, mentre SPF30 ne blocca circa il 97%. Tuttavia, questo non è del tutto preciso. Lo standard FDA per i test SPF richiede l'applicazione di 2 mg/cm² sulla pelle protetta. Si stima che lo spessore reale di un'applicazione sia tra 0,5 e 1,0 mg/cm², il che riduce l'SPF efficace. UVA2 è il principale contributore allo scurimento persistente del pigmento. In base alle nuove norme FDA, i prodotti per la protezione solare



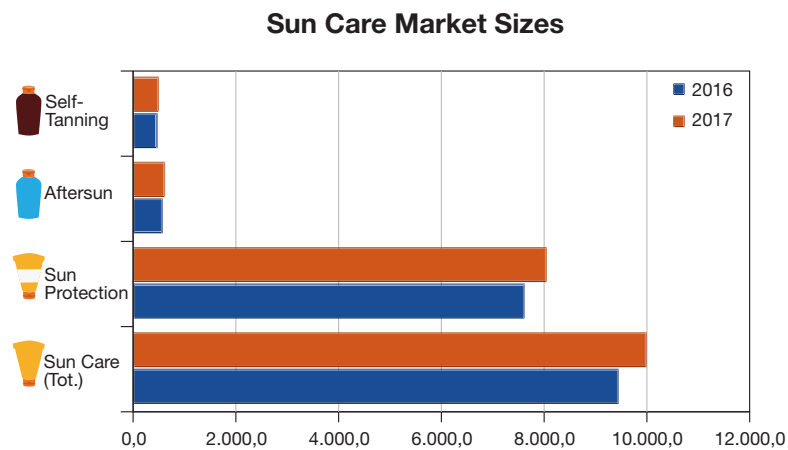
Fonte: Euromonitor International

Figura 1

sono tenuti a designare le proprietà di protezione UVA basate su un sistema di valutazione a 4 stelle, che sarà derivato da test in vivo e in vitro. Il primo test determina il fattore di protezione UVA (UVA-PF), che misura la capacità di una protezione solare per prevenire l'abbronzatura, definita come il rapporto dose minima di pigmentazione (MPD) della pelle protetta e non protetta. L'UVA-PF misura prevalentemente la protezione UVA2 (340-400 nm). Analogamente a MED, l'MPD è la quantità di UVA richiesta per produrre il primo scurimento del pigmento osservabile.

Ingredienti e tipo di veicolo

Sono 17 gli ingredienti attivi per la protezione solare approvati dalla FDA, rispetto ad almeno 34 in Australia e 28 nell'Unione Europea. Questo divario deriva dalla manipolazione di questi ingredienti da parte degli Stati Uniti, come farmaci da banco piuttosto che prodotti cosmetici, che richiedono un processo di approvazione più rigoroso ed esteso. Gli ingredienti per la protezione solare sono generalmente suddivisi in agenti inorganici e organici, precedentemente definiti bloccanti fisici e assorbitori chimici, rispettivamente. Se applicati correttamente, i filtri solari sono efficaci nel prevenire le scottature e le abbronzature acute. Hanno anche avuto successo nel ridurre alcuni effetti cronici di irradiazione UVR, tra cui immunosoppressione, fotocarcinogenesi e fotoinvecchiamento. I veicoli per la protezione solare spesso determinano l'efficacia del prodotto. Per mantenere la proprietà fotoprotettiva e la fotostabilità dei suoi filtri UV, un veicolo con protezione solare deve minimizzare l'interazione di ingredienti inerti e attivi. Il tipo di veicolo determina anche la durata della protezione solare e la resistenza all'acqua. La FDA designa i filtri solari con proprietà fotoprotettive intatte dopo due esposizioni di 20



Fonte: Euromonitor International

Figura 2

TOP GLOBAL SUN CARE MARKETS (2017-2021)

Country	2017	2021
United States	2,054.9	2,225.1
China	894.2	1,239.6
Brazil	911.6	1,148.7
South Korea	760.7	796.9
Italy	462.5	487.5
United Kingdom	467.2	486.4
France	429.2	451.3
Japan	420.3	448.9

Fonte: Euromonitor International. (retail value, \$ million)

minuti ad acqua come «resistente all'acqua». Il termine «molto resistente all'acqua» ha sostituito «impermeabilità» e si applica ai filtri solari che rimangono efficaci dopo quattro periodi di immersione in acqua di 20 minuti. È importante notare che, dopo l'esposizione all'acqua nel protocollo di test della FDA, i soggetti non eseguono test sull'asciugatura, il che non è tipico nel mondo reale. Inoltre, nonostante la loro etichetta, anche i filtri solari resistenti all'acqua possono presentare una graduale perdita di SPF con successive immersioni.

I veicoli per la protezione solare includono lozioni, creme, gel a base d'acqua, stick, spray e cosmetici. Lozioni e creme, costituite da emulsioni olio in acqua o acqua in olio, consentono la più grande varietà di formulazioni e sono più comunemente utilizzate. I gel vengono facilmente lavati via nuotando e sudando, ma sono preferiti da soggetti con pelle grassa o acne ricorrente. Gli stick sono usati per proteggere piccole aree come le labbra. Gli spray sono convenienti, ma vengono spesso

BLUE LIGHT

Il fotoinvecchiamento è una reale preoccupazione per il consumatore, la consapevolezza del danno alla pelle causato dalle radiazioni ultraviolette non si limita più solo al sole, ma include la richiesta di protezione completa dalla luce, inclusa quella blu. Quest'ultima richiesta, originata dai consumatori giapponesi più giovani, crescerà anche a livello globale, per includere la protezione dagli effetti di invecchiamento della luce blu da smartphone e altri gadget utilizzati dai consumatori in tutto il mondo. Conosciuta anche come HEV o High Energy Visible Light, la luce blu viene emessa dai nostri telefoni, tablet e computer, la ricerca ha dimostrato che la sovraesposizione alla luce blu può, accelerare i segni dell'invecchiamento, aggravando le rughe, le linee sottili e l'iperpigmentazione. L'eccessiva luce blu accelera il processo di ossidazione, che provoca l'infiammazione e danneggia la barriera cutanea, rendendola più soggetta a segni di invecchiamento, aumento del tono della pelle irregolare, opacità, pigmentazione, linee sottili e rughe.



applicati in modo insufficiente. Gli agenti di protezione solare possono anche essere trovati in prodotti per la cura dei capelli, come shampoo e tinte, per proteggerli dai cambiamenti di colore indotti dai raggi UV e dai danni alle proteine.

Il tipo di veicolo spesso ha un ruolo nell'accettazione cosmetica, nei modelli di applicazione e nella conformità. L'opacità dei filtri solari inorganici e l'untuosità degli agenti organici possono contribuire a un'applicazione inadeguata e alla successiva riduzione di SPF. L'insuccesso della protezione solare può derivare da un'applicazione insufficiente e da una riapplicazione non frequente. I possibili approcci per migliorare la compliance dei consumatori includono: promemoria giornalieri, una distribuzione obbligatoria della protezione solare e un'educazione all'uso appropriato in luoghi con esposizione solare elevata. La creazione di prodotti monouso, che devono essere utilizzati completamente durante un giorno di esposizione al sole, può anche contrastare la tendenza all'inadeguata applicazione della protezione. Un packaging innovativo può contribuire a migliorare l'applicazione, come per esempio il flacone a cambiamento di colore di Blue Lizard che avvisa gli utenti della necessità di applicare la protezione solare a livelli UV ambientali più elevati.

Conclusioni

L'uso corretto dei prodotti per la protezione dalle radiazioni solari è essenziale per la riduzione dei danni alla salute indotti dalla luce. L'applicazione sequenziale dei prodotti di bellezza quotidiani e della protezione solare non è ottimale. I prodotti skin care con SPF incorporato sembrano una soluzione promettente per una protezione solare quotidiana; tuttavia, al fine di evitare un falso senso di sicurezza, questi prodotti dovrebbero essere

sottoposti anche agli stessi criteri di prova applicati ai filtri solari. È importante tenere a mente che questo tipo di cosmetico non deve essere utilizzato come protezione solare completa, quando si è esposti al sole per molto tempo. Lo stretto legame tra ricerca scientifica e lo sviluppo di creme solari commerciali aiuta a garantire una protezione all'avanguardia. Va sottolineato che i prodotti per la protezione solare sono solo un aspetto di una protezione efficace dalla luce. Un concetto efficiente e orientato alla protezione solare è sempre multimodale, basato su una strategia che include la responsabilità individuale, opportunamente stimolata anche attraverso campagne di sensibilizzazione.

© RIPRODUZIONE RISERVATA

Marco Colombini in collaborazione
con EUROMONITOR INTERNATIONAL

BIBLIOGRAFIA

Euromonitor International. www.euromonitor.com

- Hettwer S., Gyenge E. B., Obermayer B. Blue light protecting cosmetic active ingredients: a case report. *Journal of Dermatology & Cosmetology. Volume 1 Issue 4* – 2017
- Perrotta G. An overview of sunscreen regulations in the world. *Monographic special issue: Sun care – H&PC Today – Household and Personal Care Today* – vol. 10(4) – July/August 2015
- C. Couteau, O. Couteau, S. Alami-El Boury, L.J.M. Coiffard. *Sunscreen products: What do they protect us from? International Journal of Pharmaceutics* 415 (2011) 181–184
- Raveendran S. S., Raveendran M., Anwar, M. U. The untold story of the scorching sun – A wake up call for sun protection. *Burns* 44 (2018) 77–81
- Kluschke F, Patzelt A, Lademann J, Sterry W, Lange-Asschenfeldt B. Skin care. Sun care. A successful symbiosis? *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013 Oct; 11(10):1020-1.
- <https://www.skincancer.org/prevention/uva-and-uvb>

SALICORNIA FONTE NATURALE DI FILTRI SOLARI FITOCHIMICI

Comunemente conosciuta come «asparago di mare», è una pianta alofila appartenente alla famiglia delle Amaranthaceae.

Succulenta e caratterizzata da un fusto verde scuro, articolato e fortemente ramificato che può raggiungere un'altezza compresa tra 20 e 40 cm, cresce nella maggior parte degli ambienti alcalini: bordi delle zone umide, delle paludi, delle rive del mare e delle paludi salmastre [1]. Come molte altre specie, possiede specifici meccanismi di fotoprotezione quali i fito-ormoni (poliamine) e la sintesi di polifenoli, in grado di mitigare i danni causati da un'esposizione solare ripetuta, eccessiva e cronica, particolarmente la radiazione ultra violetta di media lunghezza d'onda (UV-B compresa tra 290 e 320 nm), causa principale di immunosoppressione,

invecchiamento prematuro, melanomi e tumori maligni e benigni della pelle [2-3]. I polifenoli, appartenenti a un'ampia famiglia di metaboliti delle piante, sono considerati metaboliti secondari sebbene giochino un ruolo cruciale in molte interazioni tra le piante e il loro ambiente [4]. La struttura nucleare dei fenoli è basata sugli anelli aromatici che portano uno o più sostituenti idrossilici [5] in grado di conferire ai polifenoli la capacità di assorbire l'intero spettro UV-B di lunghezza d'onda e parte degli spettri UV-C e UV-A [3]. Le piante salmastre sono note per accumulare alti livelli di composti fenolici [6] ragione per cui un gruppo di ricercatori francesi ha scelto la *Salicornia ramosissima*, una vera alofita salmastra, distribuita in tutto il mondo, per studiarne il contenuto fenolico ottenendo risultati incoraggianti per il suo futuro utilizzo come fonte di molecole antiossidanti e per la lotta contro il fotoinvecchiamento.

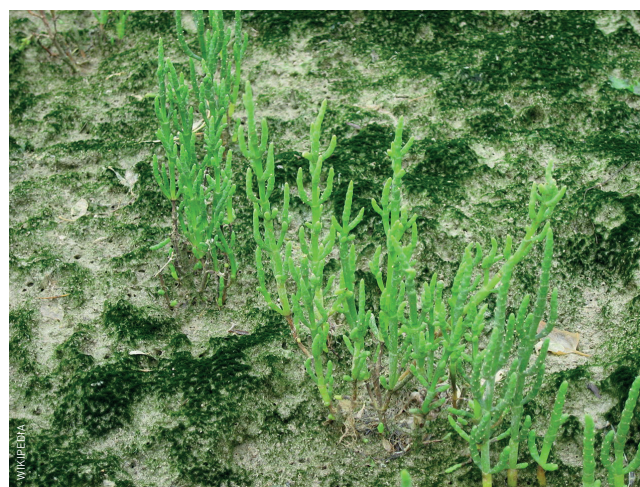


L'esperimento

Le specie *Salicornia herbaceae* e *Salicornia europaea* risultano ricche di antiossidanti, metaboliti anti-iperlipidemici, anti-diabetici, anti-trombotici, anti-microbici, antinfiammatori, anti-proliferativi, anticancro e rappresentano una fonte di vitamina C e di diuretici [7]. Lo studio condotto dai ricercatori francesi si è focalizzato sulla specie *Salicornia ramosissima*, perché particolarmente ricca di polifenoli, di cui è stata individuata

una nuova frazione naturale, fotoprotettiva e antiossidante.

Durante gli esperimenti, sono stati quantificati tutti i composti fenolici e sono state realizzate prove in vitro utili alla misurazione delle attività antiossidanti e dei sistemi scavenger delle specie radicaliche. La capacità fotoprotettiva dei filtri solari è stata testata misurando in vitro il fattore di protezione solare e il fattore di protezione UV-A. I maggiori composti fenolici della frazione attiva, sono stati identificati mediante risonanza magnetica nucleare 2D (NMR) e mediante cromatografia liquida accoppiata all'analisi spettrometrica di massa (LC-MS).



Salicornia europaea

Materiali e metodi

Per gli esperimenti sono state utilizzate esclusivamente le parti aeree di *S. ramosissima*. Dopo il lavaggio (in acqua deionizzata), il materiale vegetale è stato congelato, liofilizzato, macinato e infine conservato al buio a temperatura ambiente. Questo trattamento condizionante è stato scelto allo scopo di limitare la degradazione dei composti fenolici [8]. Mediante processi di estrazione e purificazione, a partire da 15 grammi di sostanza vegetale secca, sono stati ottenuti un estratto grezzo (CE) e due estratti semi purificati: una frazione acquosa (AF) e una frazione di acetato di etile (EAF) in cui sono stati concentrati i polifenoli. Il contenuto fenolico totale è stato quantificato sulla base di una curva standard di acido gallico mediante la procedura Folin-Ciocalteu, mentre il contenuto di flavonoidi è stato determinato sulla base di una curva standard di catechina mediante il metodo Dewanto et al.

Al fine di valutare la capacità antiossidante degli estratti, i ricercatori hanno scelto di accoppiare diversi saggi antiossidanti allo scopo di ottenere una panoramica della capacità antiossidante degli estratti attivi e quindi rappresentare la complessità dei meccanismi antiossidanti coinvolti nei sistemi biologici; fenomeno particolarmente vero per gli antiossidanti naturali, che sono generalmente multifunzionali [9]. Nel caso della *Salicornia*, sono stati eseguiti quattro test e, per ciascun test, sono stati

utilizzati gli attivi commerciali idrossianisolo butilato (BHA), trol-ox e α -tocoferolo, come controlli positivi. Il primo test, denominato candeggio del β -carotene (BCBT), implica il trasferimento del protone e simula la capacità antiossidante degli estratti, trattati con meccanismi di ossidazione simili alla perossidazione lipidica. Il secondo test verifica la capacità scavenger dei campioni nei confronti del radicale sintetico DPPH. Il terzo test valuta il

potere riducente, implica il trasferimento di elettroni e testa la capacità degli antiossidanti contenuti negli estratti di *Salicornia* di ridurre il complesso Fe^{3+} /ferrocianuro alla forma ferrosa. Il quarto e ultimo test è quello definito ORAC, si tratta di una valutazione del settore agroalimentare e riassume 2 risultati in un unico valore: la percentuale di inibizione e la rapidità di inibizione dei radicali perossilici da parte degli antiossidanti, in competizione con il substrato. Per quanto riguarda l'efficacia protettiva, in qualità di SPF e PF-UV-A, è stata determinata l'efficienza di foto-protezione degli estratti di *S. ramosissima* nei confronti delle radiazioni UV-A e UV-B mediante un protocollo messo a punto in studi precedenti [10-11]. Questo metodo *in vitro* consente di evidenziare il ruolo del filtro UV di sostanze organiche o inorganiche, che potrebbe successivamente essere applicato sulla pelle all'interno di una formulazione di protezione solare. Gli estratti sono stati incorporati in un'emulsione di base O/W per ottenere un'emulsione contenente il 10% di estratti (p/p). 50 milligrammi di emulsione preparata sono stati spalmati, usando un dito rivestito, su tutta la superficie (25 cm²) di una lastra di polimetilmetacrilato (PMMA). Dopo l'applicazione, sulla piastra rimangono solo 15 mg di

emulsione. Le misure di trasmissione tra 200 e 400 nm sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro dotato di una sfera di integrazione. Sono state preparate tre piastre per ciascun estratto da testare e sono state eseguite 9 misurazioni su ciascuna piastra. I risultati sono stati forniti come SPF e PF-UVA. Maggiore è il valore di SPF/PF-UVA, maggiore è la protezione offerta dal campione rispetto alle lunghezze d'onda UV-B/UVA assorbendole o riflettendole.

Risultati

Contenuto di fenoli e flavonoidi e resa di estrazione

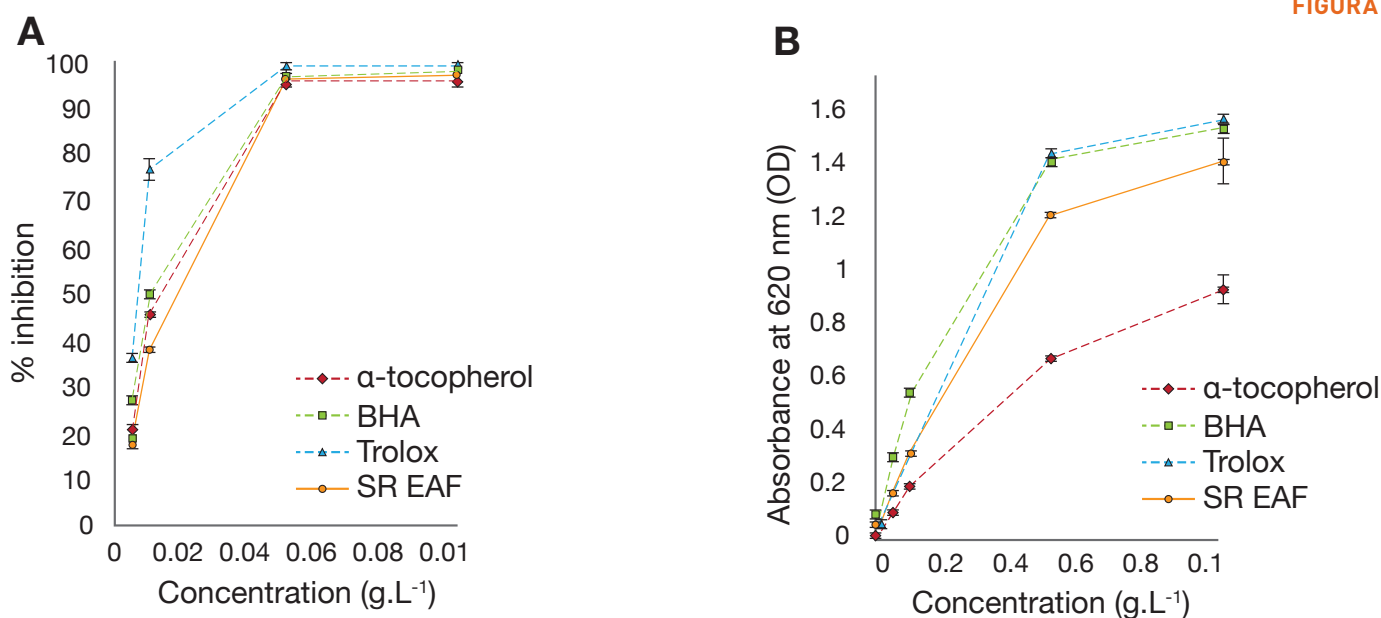
La procedura di purificazione liquida ha consentito un arricchimento di composti fenolici nella frazione EAF di *S. ramosissima*, come dimostrato dai contenuti fenolici e di flavonoidi significativamente elevati (tab 1). Il processo di semi-purificazione ha concentrato efficacemente la quantità

TAB.1 - CONTENUTO FENOLICO E DI FLAVONOIDI DEGLI ESTRATTI E DELLE FRAZIONI SEMI-PURIFICATE DI SALICORNIA RAMOSISSIMA (espresso in mg di acido gallico per g ⁻¹ di estratto secco=dw) (espresso in mg di catechina per g ⁻¹ di estratto secco=dw)			
Salicornia ramosissima			
	Estratto Crudo	Frazione EAF	Frazione AF
Contenuto Fenolico (mg GAE g ⁻¹ DW)	27.44 ± 0.68 ^a	431.55 ± 19.91 ^b	18.63 ± 0.57 ^c
Contenuto di Flavonoidi (mg C g ⁻¹ DW)	9.69 ± 0.28 ^a	368.91 ± 13.79 ^b	8.43 ± 0.14 ^c

TAB. 2 - ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DI ESTRATTI E FRAZIONI SEMI PURIFICATE DI S. RAMOSISSIMA E VARI STANDARD COMMERCIALI (α-TOCOPHEROL, BHA E TROLOX) I risultati sono espressi come medie ± SD (n= 3). Le lettere diverse indicano differenze significative tra le medie secondo i test di Berhens-Fisher. I caratteri in grassetto rappresentano la frazione più attiva					
		β-carotene (IC50 g L -1)	DPPH scavenging activity (IC50 g L -1)	Reducing power (EC50 g L -1)	ORAC value (1mol Te mg -1)
Salicornia ramosissima	CE	1.629 ± 4.21 10 ^{-02 a}	0.197 ± 2.23 10 ^{-02 a}	2.455 ± 1.03 10 ^{-01 a}	-
	EAF	0.318 ± 4.29 10 ^{-03 b}	0.013 ± 1.22 10 ^{-04 b}	0.197 ± 2.88 10 ^{-03 b}	9.06 ± 1.81
	AF	2.028 ± 1.41 10 ^{-01 c}	0.311 ± 2.52 10 ^{-03 c}	2.991 ± 1.69 10 ^{-01 c}	-
Positive controls	α-tocopherol	0.003 ± 1.50 10 ^{-04 d}	0.011 ± 7.91 10 ^{-05 d}	0.366 ± 1.12 10 ^{-02 d}	-
	BHA	0.003 ± 5.08 10 ^{-04 d}	0.010 ± 2.17 10 ^{-04 e}	0.091 ± 1.24 10 ^{-03 e}	-
	Trolox	0.003 ± 2.44 10 ^{-05 d}	0.007 ± 1.25 10 ^{-04 f}	0.169 ± 3.08 10 ^{-03 f}	-
	Ascorbic acid	-	-	-	9.35 ± 0.63 Te:
Trolox equivalent; CE: Crude Extract; EAF: Ethyl Acetate Fraction; AF: Aqueous Fraction; -: not tested.					

TAB. 3 - ATTIVITÀ DI FILTRO SOLARE DELL'ESTRATTO E DELLE FRAZIONI SEMI PURIFICATE DI S. RAMOSISSIMA IN EMULSIONE I risultati sono espressi come medie ± SD (n=3). Lettere differenti indicano differenze significative tra valori medi secondo il test Berhens-Fisher				
		SPF	PF-UVA	R
Salicornia ramosissima	CE	1.22 ± 0.03 ^a	1.21 ± 0.02 ^a	1.01
	EAF	13.57 ± 1.15 ^b	13.48 ± 1.08 ^b	1.01
	AF	1.21 ± 0.02 ^a	1.21 ± 0.02 ^a	1.00
CE: Crude Extract; EAF: Ethyl Acetate Fraction; AF: Aqueous Fraction; SPF: Sun Protective Factor; PF-UVA: Protection Factor against UVA; R = SPF/PF-UVA				

FIGURA 1



(A) Attività scavenger del campione nei confronti del radicale libero DPPH.

(B) potenziale di riduzione della frazione di acetato di etile di *S. ramosissima* (SR EAF) rispetto agli standard commerciali (α -tocoferolo, BHA e Trolox) in diverse concentrazioni. I risultati rappresentati sono medie (n = 3).

(Immagine tratta da: Gwladys Surget, Valérie Stiger-Pouvreau, Klervi Le Lann, Nelly Kervarec, Céline Couteau, Laurence J.M. Coiffard, Fanny Gaillard, Karine Cahier, Fabienne Guérard, Nathalie Poupart. Structural elucidation, in vitro antioxidant and photoprotective capacities of a purified polyphenolic-enriched fraction from a saltmarsh plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 143 (2015) 52–6)

di composti fenolici dal 15,7 per raggiungere il 43,2% di purezza nell'EAF rispetto all'estratto grezzo. I flavonoidi rappresentano quasi l'86% di questa frazione. La frazione AF è significativamente più povera di composti fenolici e flavonoidi, rispetto all'estratto grezzo.

Attività antiossidante

La frazione EAF ha mostrato l'attività antiossidante più alta, qualunque test sia stato eseguito (tab. 2). Per il test BCBT, non è stata rilevata alcuna attività (IC₅₀ elevato rispetto ai controlli positivi), a dimostrazione del fatto che le proprietà antiossidanti degli estratti, in particolare di EAF, sono meno attive nell'emulsione. Questo effetto è principalmente dovuto alla loro polarità, in quanto si tratta di un test più specifico per molecole lipofile. Per il dosaggio DPPH, l'attività antiossidante di EAF (con un IC₅₀ pari a $0,013 \pm 1,22 \times 10^{-4}$ g L⁻¹) è equivalente a quella degli standard commerciali come α -tocoferolo e BHA, anche se è stata mostrata una differenza significativa. Tra tutti i saggi, l'attività più forte per EAF è stata dimostrata nel test del potere riducente, con un'attività significativamente

più elevata rispetto a quella dell' α -tocoferolo (EC₅₀ pari a $0,197 \pm 0,003$ e $0,366 \pm 0,011$, rispettivamente). Questi risultati suggeriscono che le molecole presenti nella frazione EAF hanno una forte capacità di ridurre gli ioni ferrici, in funzione della loro concentrazione all'interno della frazione. In corrispondenza del valore $0,1$ g L⁻¹, EAF ha presentato la stessa attività di Trolox (fig. 1). EAF sarebbe adatto per l'uso in un contesto industriale in quanto ha mostrato un valore ORAC di $9,06 \pm 1,81$ μ mol Te mg⁻¹, equivalente al valore ORAC dell'acido ascorbico ($9,35 \pm 0,63$ mol Te mg⁻¹) e superiore a valori ORAC di prodotti antiossidanti noti, come tè nero, verde o bianco ($2,64 \times 10^{-3}$ - $1,25 \times 10^{-2}$ mol Te mg⁻¹) [12].

Attività fotoprotettiva

L'emulsione O/W prodotta con la frazione arricchita di composti fenolici degli estratti di *Salicornia* ha mostrato un SPF *in vitro* elevato, pari a 13,57, molto più alto rispetto ai valori ottenuti dall'estratto grezzo e acquoso, rispettivamente pari a $1,22 \pm 0,03$ e $1,21 \pm 0,02$ (tab.3). Ad eccezione dell'anisotriazina, l'SPF ottenuto dall'emulsione di *Salicornia* è superiore a

tutti quelli dei diciotto filtri UV sintetici, puri, autorizzati nell'Unione Europea testati in emulsione O/W con lo stesso metodo [13]. L'estratto della frazione EAF ha mostrato attività di protezione solare anche contro gli UV-A, mostrando un valore di PF-UV-A pari a 13,48. I fattori di protezione UV-B e UV-A di EAF risultano bilanciati, con valori SPF e PF-UV-A equivalenti. Secondo i ricercatori, la frazione EAF ottenuta da *S. ramosissima* è molto interessante perché sembra assorbire efficientemente radiazioni UV ad ampio spettro.

Altri filtri solari naturali

Le sostanze naturali estratte dagli organismi sono state recentemente considerate potenziali filtri solari, grazie alla loro capacità di assorbimento nella regione UV e al loro potere antiossidante [14]. Tra gli organismi terrestri, Lohézic-Le Dévéhat et al. hanno dimostrato, usando lo stesso metodo UV *in vitro*, che anche i licheni potrebbero essere buoni filtri UV. Tra tre specie licheniche, un estratto acetico di *Lasallia pustulata* possiede i valori massimi di SPF e PF-UVA pari, rispettivamente a 5,52 e 2,45. Sono stati testati 10 metaboliti lichenici e il miglior risultato è stato ottenuto per un acido giroforico (SPF pari a 5,03), il principale composto di *L. pustulata*. Rancan et al. ha mostrato che i composti aromatici isolati dai licheni cileni e i principali alcaloidi delle foglie e la corteccia dell'albero boldo

(*Peumus boldus* M.) potrebbero rappresentare interessanti filtri UV. Dal loro studio, l'acido usnico è stato descritto come il miglior filtro UVB testato su 5 volontari umani, con un fattore di protezione (pari a 4.1), simile a un solare spray di grande successo commerciale. Rispetto a questa letteratura, sembra che il pool di molecole presenti nella frazione EAF di *S. ramosissima* rappresenti un candidato interessante e originale per fornire un'azione schermante protettiva efficace sull'intera gamma UVA-UVB. Le normative cosmetiche richiedono che si formuli un mix di composti e allo stesso tempo si caratterizzino tutte le molecole presenti nella frazione attiva (come hanno fatto i ricercatori francesi). Si può senza dubbio affermare che l'effetto del pool creato nella frazione EAF della *S. ramosissima* è simile ai filtri sintetici puri UV, attualmente utilizzati nell'industria cosmetica.

La frazione EAF di questa pianta salmastra, produce un'ampia varietà di composti fenolici, flavonoidi e derivati dell'acido caffeico che sono stati individuati mediante analisi NMR. Tra i principali si ricordano isorhamnetin; isorhamnetin 3-glucoside; quercetin 3-glucoside; caffeic acid e i suoi derivati, che contribuiscono ad aumentare le attività antiossidante e foto-protettiva.

© RIPRODUZIONE RISERVATA

Donatella Barillaro cosmetologa

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Millie C (2015) *Salicornia* spp. as a biomonitor of Cu and Zn in salt marsh sediments. *Ecol Indic* 56:70–78.
- [2] J. Rozema, J. van de Staaij, L.O. Björn, M. Caldwell, UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation, *Trends Ecol. Evol.* 12 (1997) 22–28.
- [3] M. Ichihashi, M. Ueda, A. Budiyanto, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, et al., UV-induced skin damage, *Toxicology* 189 (2003) 21–39.
- [4] A.-M. Boudet, Evolution and current status of research in phenolic compounds, *Phytochemistry* 68 (2007) 2722–2735.
- [5] L. Bravo, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr. Rev.* 56 (1998) 317–333.
- [6] T.M. Arnold, N.M. Targett, Marine tannins: the importance of a mechanistic framework for predicting ecological roles, *J. Chem. Ecol.* 28 (2002) 1919–1934.
- [7] V. Isca, A.M. Seca, D.C. Pinto, A. Silva, An overview of *Salicornia* genus: the phytochemical and pharmacological profile, in: V.K. Gupta (Ed.), *Natural Products: Research Review*, vol. 2, Daya Publishing House, New Delhi, 2014, pp. 145–164.
- [8] K. Le Lann, C. Jégou, V. Stiger-Pouvreau, Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross, *Phycol. Res.* 56 (2008) 238–245.
- [9] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1841–1856.
- [10] C. Couteau, M. Pommier, E. Paparis, L.J.M. Coiffard, Study of the efficacy of 18 sun filters authorized in European Union tested *in vitro*, *Pharm. – Int. J. Pharm. Sci.* 62 (2007) 449–452.
- [11] S. Elboury, C. Couteau, L. Boulande, E. Paparis, L. Coiffard, Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by *in vitro* method, *Int. J. Pharm.* 340 (2007) 1–5.
- [12] D.J. Charles, *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*, Springer Science & Business Media, 2012.
- [13] A.J. Davy, G.F. Bishop, C.S.B. Costa, *Salicornia* L. (*Salicornia pusilla* J. Woods, *S. ramosissima* J. Woods, *S. europaea* L., *S. obscura* P.W. Ball & Tutin, *S. nitens* P.W. Ball & Tutin, *S. fragilis* P.W. Ball & Tutin and *S. dolichostachya* Moss), *J. Ecol.* 89 (2001) 681–707.
- [14] F. Rancan, S. Rosan, K. Boehm, E. Fernández, M.E. Hidalgo, W. Quihot, et al., Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens, *J. Photochem. Photobiol. B* 68 (2002) 133–139.

NANOMATERIALI: CONTROLLO DIMENSIONALE DELLE POLVERI NEI COSMETICI

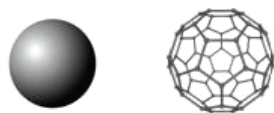
Con l'aumentata presenza dei nanomateriali nei prodotti commerciali, un dibattito pubblico crescente sta emergendo sui costi sociali e ambientali delle nanotecnologie e se questi abbiano più importanza rispetto ai molteplici benefici. Il prefisso «nano» non è solo legato all'idea di innovazione e progresso tecnologico, ma solleva una mole rilevante di dubbi che riguardano l'impatto sulla salute umana e sull'ambiente



Le analisi fin qui condotte sui prodotti cosmetici, al fine di garantirne la sicurezza, si sono concentrate principalmente sulla ricerca di inquinanti, sia di natura microbiologica che chimica, sostanze tossiche e allergeniche. Recentemente però l'attenzione si è molto focalizzata sulla presenza e sulla tossicità dei nanomateriali che, al diminuire delle dimensioni, modificano le caratteristiche della materia dando origine ad entità del tutto nuove dalle caratteristiche poco conosciute. Le proprietà fisico-chimiche dei nanomateriali infatti possono differire da quelle della sostanza sfusa o da particelle di dimensioni maggiori e si possono produrre effetti biologici talora non prevedibili e non del tutto compresi. Questo fenomeno risulta essere particolarmente inquietante quando questi vengono impiegati in materiali e prodotti di largo consumo e di uso quotidiano che entrano in diretto contatto con l'uomo e che pertanto possono rappresentare un serio rischio per la salute umana; si è quindi rapidamente sviluppata la nanotossicologia, una nuova disciplina che approfondisce le conoscenze sui fenomeni che si svolgono all'interfaccia tra nanomateriali e sistemi biologici (1). La nanotossicologia è nata dallo studio di nanoparticelle incidentali, ma oggi è principalmente orientata allo studio di materiali ingegnerizzati (1) quali dendrimeri, fullereni, nano-argille, *quantum dots*, nanotubi, nanomateriali metallici o a base di ossidi metallici (ferro, argento, titanio, alluminio, zinco, cerio) o di carbone (2) che affollano numerosi la nostra vita sotto forma di cosmetici, integratori alimentari, medicinali, articoli sportivi, tessuti, materiali plastici in generale, utensili di uso quotidiano (3). Sul mercato quindi è già presente un gran numero di prodotti contenenti nanomateriali che offrono notevoli opportunità tecniche e commerciali, ma che possono comportare rischi per l'ambiente e preoccupazioni per la salute e la sicurezza dell'uomo e degli animali.

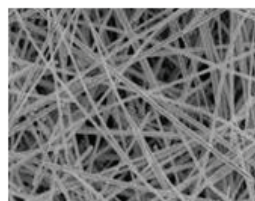
In base al Regolamento 1223/2009/CE (Art. 2) sui prodotti cosmetici, la definizione di nanomateriale è «ogni materiale insolubile o *biopersistente* e fabbricato intenzionalmente avente una o più dimensioni esterne, o una struttura interna, di misura da 1 a 100 nm». I nanomateriali possono essere classificati in base a vari criteri quali l'origine, i costituenti ecc. ma forse la classificazione universalmente accettata è quella basata su dimensione e orientamento nello spazio. Possono dunque essere adimensionali e quindi generalmente sferici, monodimensionali come nanofili o nanotubi, in quanto una dimensione è nanometrica e l'altra nettamente superiore, oppure bidimensionali a singolo strato formando un vero e proprio film con spessore nanometrico. Questi film inoltre possono esistere anche in forma organizzata a costruire

strutture adimensionali 0-D

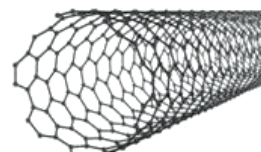


nanoparticelle (quantum dots)

strutture monodimensionali 1-D

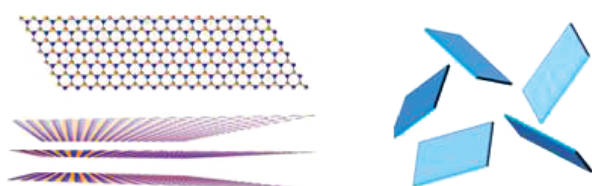


nanofili



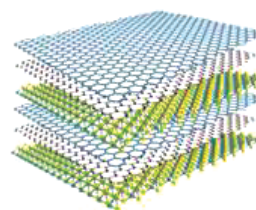
nanotubi

strutture bidimensionali 2-D



nanofilm singolo strato

strutture tridimensionali 3-D



nanofilm multistrato

FIGURA 1

un «pacchetto» di film impilati, formando una struttura tridimensionale, ovvero un nanofilm multistrato (fig.1). La definizione del Regolamento 1223/2009/CE è stata considerata non esaustiva ma è quella a cui si devono riferire le industrie cosmetiche per applicare la normativa specifica sui loro prodotti contenenti nanomateriali. Anche le linee guida *nano guidance* package a cura di Cosmetics Europe infatti affermano di fare riferimento a questa definizione. Molto spesso nanoparticelle non degradabili (argento, biossido di titanio, ossido di zinco) sono presenti in prodotti per i quali non vengono richieste analisi tossicologiche approfondite, come per esempio prodotti per la cura della persona, detersivi, prodotti per la casa, prodotti alimentari (1, 4). Sono stati effettuati studi che hanno trovato notevoli correlazioni tra insorgenza di tumori e contatto protratto nel tempo con polveri, apparentemente inerti, che per la loro forma e dimensione potevano invece arrecare gravi danni cellulari. Il caso più noto è sicuramente quello dell'amianto responsabile dell'insorgenza di mesotelioma (5), ma anche altre polveri inorganiche, utilizzate nella cura della persona e considerate sicure, sembra possano non essere del tutto innocue. È questo il caso del talco che, se utilizzato nella zona perineale femminile, sembra poter essere implicato

nell'aumentata probabilità di insorgenza del cancro endometriale (adenocarcinoma) (6) o ovarico (7). Altri casi oggetto di discussione sono quelli di polveri, soprattutto di natura inorganica, largamente presenti in cosmetici sia come ingredienti attivi (adsorbente, antilucido, coprente, colorante, opacizzante, antisettico, lenitivo, schermo UV) che come ausiliari della formulazione (texturizzante, assorbente, legante, agente di scorrevolezza, filler, addensante). Queste polveri possono essere utilizzate come tali, in formulazioni aspersorie per il corpo, nel make up (cipria, fondotinta compatto, blush, terra, ombretto) o sotto forma di sospensione in deodoranti, stick per labbra, maschere, creme e soprattutto in formulazioni per la protezione solare, che spesso vengono raccomandate proprio per i bambini. Sembra che queste polveri possano essere responsabili di effetti nocivi a carico dell'apparato respiratorio, circolatorio, immunitario, renale e nervoso (8-20) e che questa implicazione sia dovuta alle dimensioni nanometriche. Sicuramente la via maggiormente coinvolta nell'assorbimento di nanomateriali è quella respiratoria, ma questa si riferisce principalmente ai nanomateriali puri (materie prime) e interessa principalmente i lavoratori esposti a queste sostanze negli ambienti di lavoro e marginalmente

gli utenti di un prodotto finito, come un cosmetico. A tale riguardo occorre ricordare la potenziale pericolosità di prodotti per la protezione solare, contenenti nanomateriali, che sono disponibili sotto forma di spray e che permettono di dispensare il contenuto sottoforma di aerosol sulla pelle, ma anche nell'ambiente con rischio di inalazione. Queste particelle così piccole vengono riconosciute con difficoltà dai sistemi fisiologici preposti alla rimozione di fibre e polveri e manca dunque, nei loro confronti, il meccanismo di difesa che opera sui corpi estranei di dimensioni maggiori assunti per inalazione. A tal proposito occorre ricordare che il Comitato Scientifico per la Sicurezza dei Consumatori (CSSC) per la Commissione Europea ha chiarito che il biossido di titanio «nano» può essere utilizzato in creme solari (è stato aggiunto nell'allegato VI) in quanto non dovrebbe porre alcun rischio significativo per il consumatore, dopo applicazione cutanea, ma avverte altresì che non è considerato sicuro in forma a spruzzo, né in qualsiasi situazione in cui per inalazione può arrivare ai polmoni.

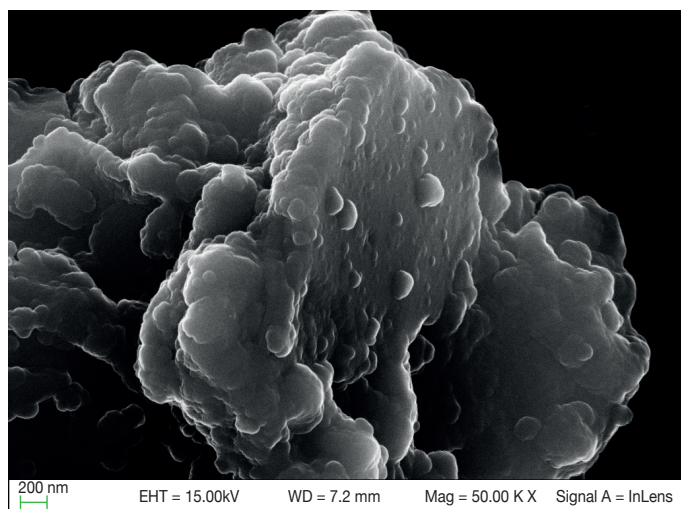
Per quanto riguarda nanomateriali eventualmente contenuti in prodotti cosmetici, l'assorbimento può avvenire per via cutanea, respiratoria o orale. Naturalmente la via orale non è una via di somministrazione per cosmetici, ma può essere coinvolta a seguito di involontaria ingestione di formulazioni applicate su labbra, denti e mucose buccali o di prodotto rimasto sulle mani dopo l'applicazione (10) oppure per assunzione di integratori alimentari, spesso proposti in associazione col cosmetico, come coadiuvanti per attenuare un inestetismo. Le nanoparticelle applicate topicamente potrebbero attraversare l'epidermide umana con il rischio di una potenziale esposizione sistemica, specialmente attraverso la cute danneggiata, oppure potrebbero essere fagocitate. Sempre a causa della ridotta dimensione, queste particelle riescono a eludere i meccanismi naturali di difesa del sistema immunitario e interagiscono liberamente con i sistemi biologici e con gli ecosistemi, in maniera non del tutto prevedibile. Probabilmente la prima reazione dovuta al contatto tra nanomateriale e struttura biologica è rappresentata da stress ossidativo a carico delle membrane cellulari, con conseguente risposta infiammatoria, a cui seguono citotossicità (danno strutturale) e genotossicità (14). La tossicità di un prodotto può non dipendere solo dall'attività intrinseca delle molecole, ma anche dal loro stato di aggregazione, dalla loro forma e grandezza. Sulla base di ciò, il concetto di tossicità deve essere considerato in maniera più ampia, non può essere legato solo all'attività intrinseca di un prodotto, ma anche alla sua morfologia, in quanto geometria, lunghezza e spessore

contribuiscono alla biopersistenza e a «ingannare» le strutture cellulari provocando gravi effetti tossici (15-20).

Per quanto riguarda la grandezza, occorre ribadire che le polveri di dimensioni nanometriche sono quelle più pericolose e, attualmente sono sotto osservazione, sono oggetto di studio e dibattito. L'eventuale assorbimento di nanomateriali deve essere ulteriormente investigato, ma si è ipotizzato che nanoparticelle assorbite, in virtù della loro reattività superficiale, siano responsabili dell'«effetto corona» ovvero tendano a formare aggregati a interagire con componenti del sangue, soprattutto proteine, creando complessi circolanti con potere immunogeno e con molte implicazioni biologiche (21). In aggiunta a ciò l'impiego di nanoparticelle di alluminio (idrossido o idrossifosfato come adiuvante in vaccini) è stato legato alla comparsa di reazioni avverse classificate come ASIA (*Autoimmune Syndrome Induced by Adjuvants*) o encefalopatie e una recente ricerca scientifica (22,23) ha correlato la tossicità a livello del sistema nervoso centrale con la distribuzione particellare, individuando una possibile inclusione dell'alluminio idrossido nei globuli rossi, con distribuzione in tutto l'organismo e forse anche oltre la barriera ematoencefalica.

Recentemente quindi si è aperta la problematica dei «nanomateriali nei prodotti cosmetici», argomento che viene affrontato seriamente da chi si occupa della sicurezza dei prodotti cosmetici e dagli enti regolatori che hanno emanato linee guida e regolamenti molto precisi. Il problema della tossicità dei nanomateriali è tanto sentito che attualmente vengono monitorati anche i materiali per il packaging di prodotti alimentari, farmaceutici e cosmetici (24). Materiali nanoparticellari, soprattutto di natura inorganica, infatti possono essere addizionati a vari tipi di matrici polimeriche (es. PE, PET), così come alle bioplastiche, per l'ottenimento di nanocompositi che trovano buona applicazione nel settore del packaging per le migliorate performance tecniche come resistenza meccanica, impermeabilità e infiammabilità (24). Parallelamente a questo vantaggio si apre però il problema della migrazione delle nanoparticelle dal contenitore al prodotto (cosmetico) che quindi può essere «inquinato» e reso nocivo. Secondo la Raccomandazione 696/2011/UE un nanomateriale, per essere definito tale, deve essere composto per almeno il 50% di particelle di dimensioni comprese tra 1 e 100 nanometri. La Raccomandazione sopra citata prevede, inoltre, che tale soglia debba essere rivista in quanto ci possono essere specifici casi in cui le preoccupazioni per l'ambiente, la salute e la sicurezza giustificano l'applicazione di una soglia al di sotto del 50%.

FIGURA 2



Individuare le nanoparticelle

Sulla base della normativa vigente e delle preoccupazioni espresse dal Legislatore e dalle Agenzie regolatorie, è necessario avere a disposizione tecniche sensibili e precise per poter individuare e quantificare con certezza la presenza di nanomateriali nei prodotti, sia che questi derivino dal packaging o, principalmente, dalle materie prime utilizzate. Esistono molti tipi di analisi da utilizzare, spesso anche in combinazione, che sono applicabili in maniera molto specifica (es. tecniche immunologiche) oppure generale come la microscopia elettronica a scansione (SEM) che permette di osservare i campioni, opportunamente metallizzati, a un elevato grado di ingrandimento. Come si può osservare dalla figura 2, micrografia che mostra un materiale inorganico argilloso ingrandito di ben 50.000 volte, si possono ottenere immagini estremamente nitide che permettono di vedere attentamente la morfologia del materiale andando a osservare la superficie esterna di una singola particella. È però da tenere in considerazione che il campione sottoposto ad analisi è generalmente molto piccolo e quindi spesso non è rappresentativo della polvere allo studio. Dall'osservazione della figura 3, che mostra un ingrandimento di 12800 X di un materiale siliceo, si può inoltre capire che quando è necessaria una visione d'insieme del materiale, non è facile avere un'immagine omogenea di tutte le popolazioni che fanno parte di una polvere.

Inoltre questo metodo permette di analizzare materiali puri e non in miscela con altri, come nel caso di una formulazione cosmetica. Si può concludere quindi che la tecnica SEM è idonea principalmente per svolgere studi qualitativi su materiali puri (isolati) e qualsiasi valutazione dimensionale

FIGURA 3

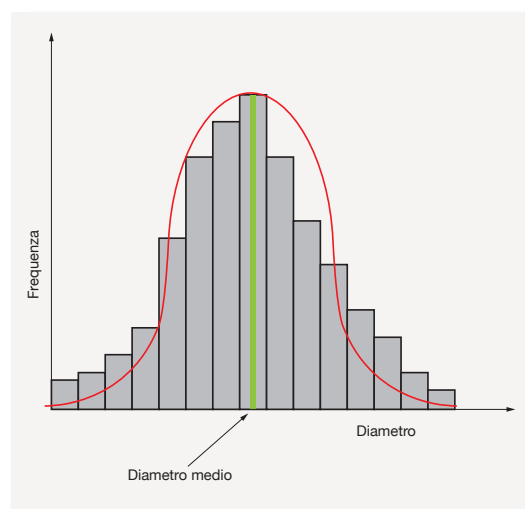
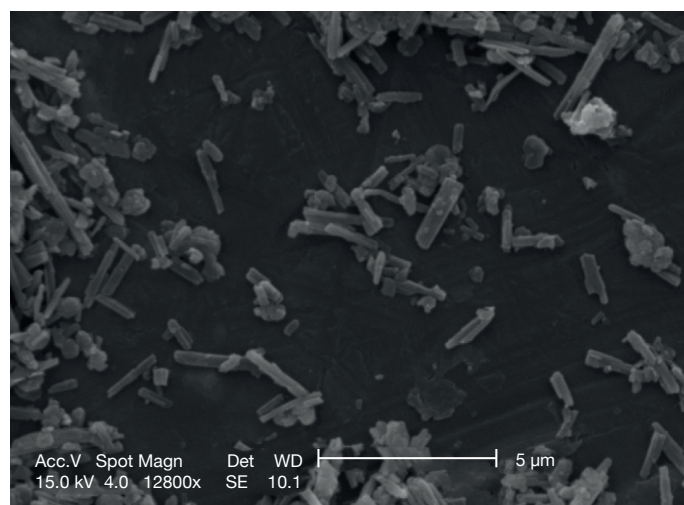


FIGURA 4

quantitativa non potrà avere valore statistico. Quando si parla di una polvere infatti non si può pensare che tutte le particelle che la compongono, assimilate per convenzione a delle sfere, siano tutte della stessa grandezza e quindi è corretto parlare di distribuzione particellare, ovvero di una polvere che è formata da tante «famiglie» di particelle più grandi e più piccole, con diametri variabili, che prendono il nome di classi dimensionali. L'insieme delle classi dimensionali (istogrammi) rappresenta la distribuzione dimensionale della polvere che matematicamente può essere descritta da una gaussiana (linea arancione). Il parametro generalmente utilizzato per indicare in modo semplice e immediato la grandezza particellare è il valore del diametro medio (fig. 4).

Una distribuzione normale della polvere (gaussiana) è una distribuzione unimodale simmetrica (fig. 5A) e in questo caso si può assumere che il valore del diametro medio delle particelle sia rappresentativo della polvere. Nella realtà però molto

FIGURA 5

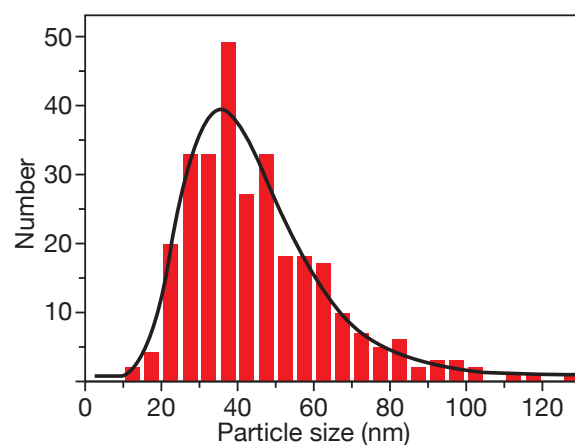
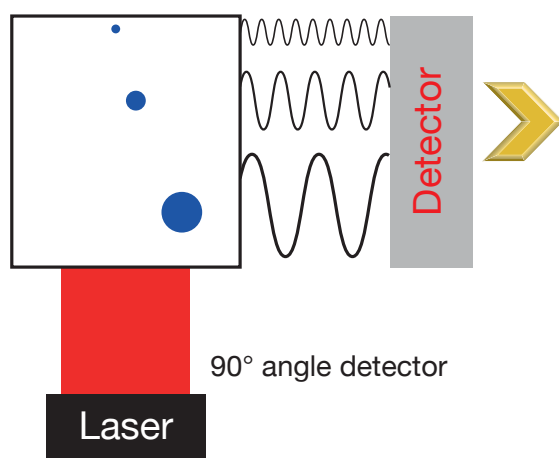
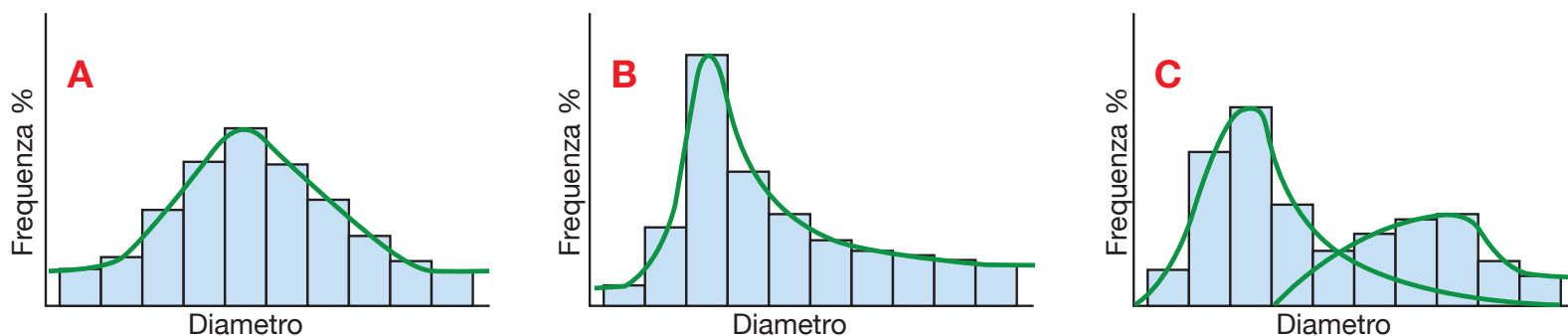


FIGURA 6

spesso si ottengono distribuzioni non simmetriche con la parte (destra per esempio) più estesa, ovvero una distribuzione/ curva scodata (fig. 5B) e anche distribuzioni bimodali (fig. 5C). In questi casi, ovviamente, il riferimento al valore del diametro medio non è rappresentativo della polvere.

La ricerca di nanoparticelle

Se stiamo ricercando delle nanoparticelle, è chiaro che il metodo che interessa è relativo alle particelle «piccole» (submicroniche) quindi è necessario utilizzare tecniche idonee e come il DLS (*Dynamic Light Scattering*) ovvero diffusione dinamica della luce (spettroscopia a correlazione di fotoni o diffusione quasi elastica della luce). Quando la luce colpisce le piccole particelle in movimento si disperde in tutte le direzioni (dispersione di Rayleigh) e l'intensità di dispersione (*scattering*), fluttuazione dipendente dal tempo, operata dalla presenza di particelle in movimento, viene misurata grazie

a un autocorrelatore che calcola la velocità delle variazioni d'intensità e il coefficiente di diffusione. Questi parametri sono alla fine riconducibili al particle size delle particelle sulla base del fatto che la variazione di intensità misurata è funzione della grandezza particellare, poiché le particelle più piccole si muovono più velocemente (fig. 6).

La possibilità quindi di rintracciare particelle nanometriche in una formulazione cosmetica, siano esse derivanti dalla migrazione dal packaging o dalle materie prime utilizzate, dipende strettamente dal metodo utilizzato che deve essere idoneo e accurato. Naturalmente tutte le materie prime impiegate nella preparazione di una formulazione dovrebbero essere sottoposte a questo tipo di analisi per avere la certezza di non introdurre in una preparazione un materiale non sicuro. Sarebbe opportuno che i certificati di analisi e le schede di sicurezza delle materie prime riportassero, accanto a tutti i dati chimico-fisici del prodotto, anche la loro grandezza

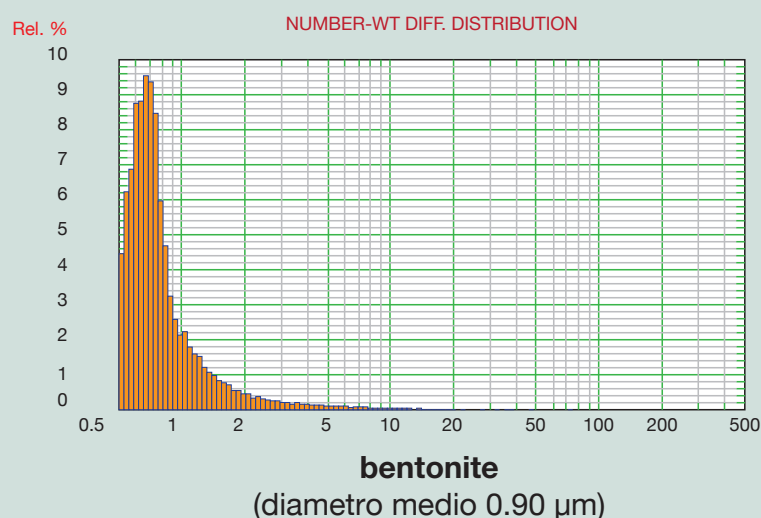
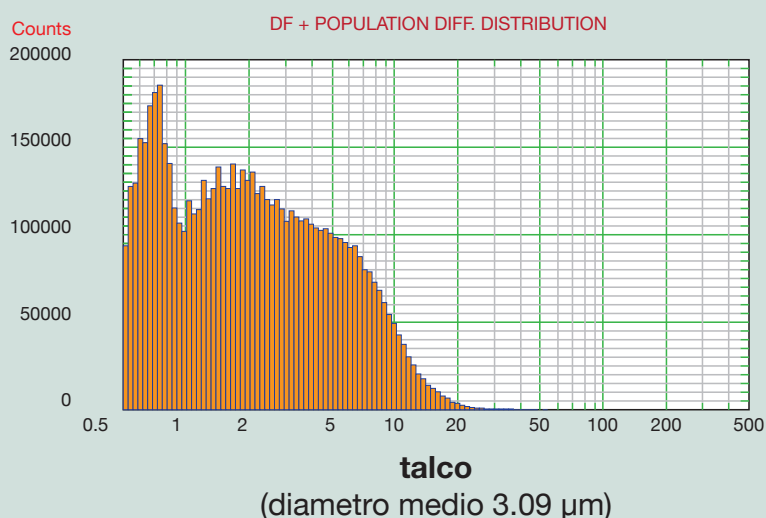


FIGURA 7

STRUMENTI PER MISURE GRANULOMETRICHE

Lo studio del particle size di una polvere e la costruzione della relativa curva di distribuzione può essere effettuato con vari strumenti. Quello che permette di ottenere risultati molto precisi, sia in termini qualitativi che quantitativi, si basa sull'irradiazione delle particelle

in sospensione con un raggio di luce monocromatica (laser) che diffonde attraverso il campione e la cui intensità, dietro al campione, viene misurata da uno speciale detector. La risposta delle particelle alla diffusione della luce è diversamente calcolabile a seconda

che queste siano grandi o piccole; generalmente il confine tra grande e piccolo prevede la suddivisione in particelle microniche e submicroniche (o nano particelle) e tecnicamente il punto di suddivisione è fissato al valore di 0,5 micron (diametro).

particellare, che non dovrebbe essere espressa solo come diametro medio, infatti, ma proprio come distribuzione dimensionale e soprattutto in relazione al metodo di rilevazione utilizzato. Se i dati relativi alla grandezza particellare non sono stati ben prodotti potrebbero essere non attendibili.

A tal proposito sono state scelte delle polveri (talco e argille) ampiamente utilizzate come tali o in formulazioni cosmetiche, e analizzate con un *particle sizer* a raggio laser (*Accusizer Optical particle sizer model 770 Santa Barbara - USA*) che fornisce sia un'elaborazione grafica (fig. 7) che una serie di dati relativi al campione come per esempio numero esatto delle particelle lette, range dimensionale delle varie classi, percentuale della classe nell'intero campione, concentrazione del campione, fattore di diluizione... e anche il valore del diametro medio. Facendo riferimento semplicemente a quest'ultimo parametro, tutte le 4 le polveri prese in considerazione possono essere considerate sicure, in quanto tutti i valori dei diametri medi (3.09, 0.90, 2.80, 3.60 micrometri) indicano grandezze micrometriche e quindi assenza, si potrebbe pensare, di nanoparticelle. Se invece si osserva con attenzione ogni grafico dell'analisi granulometrica si possono trarre numerose altre

considerazioni, prima tra tutte che le analisi non sono state svolte in modo accurato e risultano incomplete in quanto le curve di distribuzione sono «tagliate» nella parte sinistra della scala, proprio nella parte delle dimensioni più piccole. Risulta quindi chiaro che il valore di diametro medio è stato calcolato solo sulle particelle che lo strumento è riuscito a contare e non sul reale campione di polvere.

Per quanto riguarda il talco, largamente utilizzato come polvere aspersoria anche per bambini e in bagnoschiuma, doccia-schiuma, saponi, deodoranti, si può osservare che il campione (commerciale) ha una distribuzione trimodale: questo potrebbe dipendere da difetti di macinazione, dalla mancanza di setacciatura o dal fatto che nel campione non sia presente solo fillosilicato di magnesio, ma anche acido borico o altri minerali a base di alluminio, titanio, ferro e manganese.

Nel caso della bentonite, argilla cationica impiegata per maschere, impacchi, fanghi e in molteplici formulazioni cosmetiche con attività adsorbente o semplice costituente base, si può intravedere una distribuzione unimodale presumibilmente ristretta e omogenea, ma sicuramente mancante della parte della curva che cade al di sotto del micron.

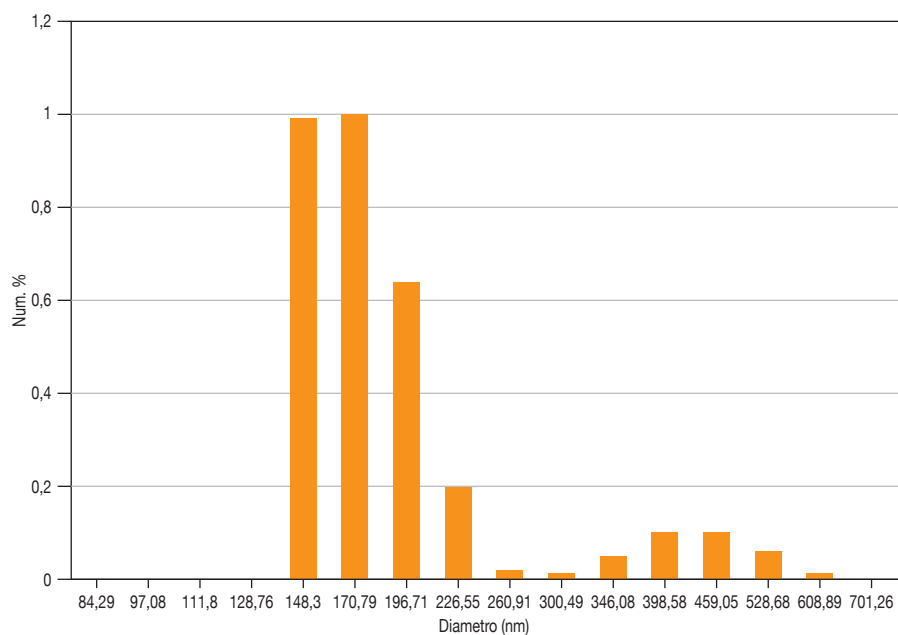
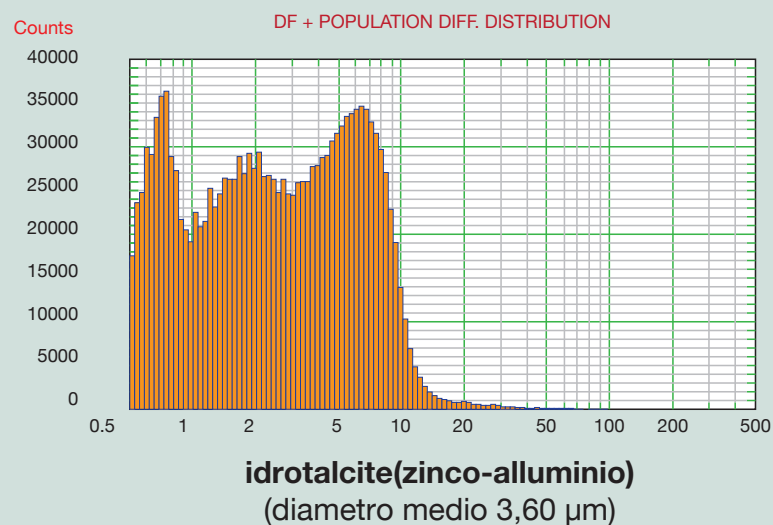
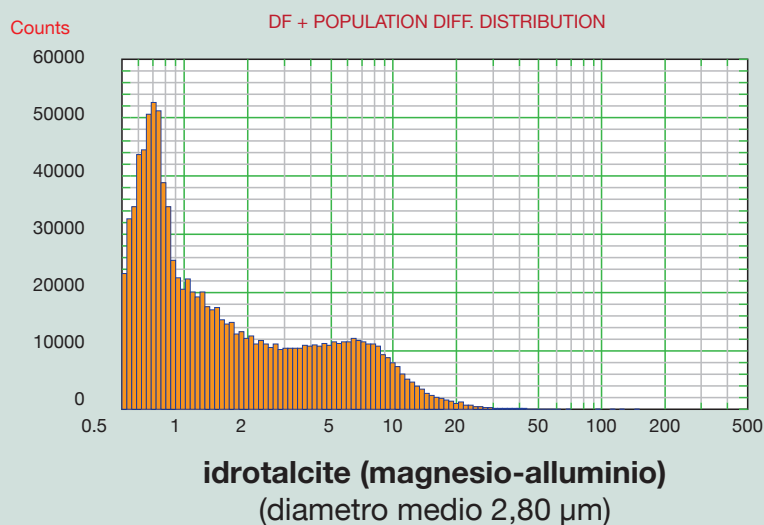


FIGURA 8 - Frazione Nanometrica

presentato in figura 7, è stato sottoposto ad analisi dimensionale mediante l'impiego di un particle size DLS a raggio laser (NICOMP 380 ZLS, PSS Nicomp Santa Barbara -USA) al fine di caratterizzare la popolazione nanometrica al di sotto dei 0,5 micron.

La figura 8, che rappresenta un completamento della distribuzione ottenuta mediante analisi granulometrica, evidenzia chiaramente che, oltre alla popolazione micrometrica, esistono due sottopopolazioni nanometriche, la prima con diametro nel range di 148-260 nanometri e la seconda tra 300 e 600 nanometri. I dati di questa analisi suggeriscono quindi due considerazioni: i) che la polvere oggetto dello studio presenta un'elevata disomogeneità

Nel caso delle idrotalciti, argille anioniche impiegate in formulazioni cosmetiche e anche nel packaging come «catturatore» di acidità nei polimeri termoplastici (PVC) e nei *compounds* additivati con ritardanti di fiamma, non si può parlare di curva di distribuzione, in quanto nel caso di quella a base di magnesio e alluminio ce ne sono due, mentre in quella a base di zinco e alluminio tre. Risulta quindi evidente che il valore del diametro medio non può essere un parametro rappresentativo del campione, sia perché si riferisce a una distribuzione non unimodale, sia perché manca completamente la «lettura» della frazione submicronica. A tal proposito il campione di idrotalcite (magnesio-alluminio),

dimensionale non consentendo di raggruppare tutta la popolazione particellare sotto un'unica gaussiana, ii) che analisi condotte in modo non appropriato potrebbero non rivelare la presenza di nanomateriale.

È molto importante sottolineare la sensibilità di questa tecnica nel rilevare anche piccole percentuali di particelle nanometriche presenti in un campione. Questo è tanto più importante se si pensa che la maggior parte delle patologie che insorgono in seguito a esposizione a polveri nanometriche è il risultato di un contatto protratto nel tempo a quantità trascurabili che però inducono una graduale stimolazione e modifica degli equilibri fisiologici, con conseguente alterazione di alcune funzionalità.

Conclusioni

A seguito delle recenti acquisizioni sulla tossicità dei nanomateriali, il concetto di sicurezza dei prodotti alimentari, dietetici, integratori, nutraceutici e anche cosmetici, sebbene questi ultimi destinati a un uso esterno, è sempre più legato alla grandezza e alla morfologia delle particelle utilizzate come materie prime, ma anche eventualmente cedute dal materiale di confezionamento al prodotto. È necessario, quindi, che lungo la filiera dei prodotti che hanno un impatto sulla salute, in ogni momento della lavorazione, eseguire controlli che assicurino la qualità del prodotto e l'assenza di nanomateriali. Particolare attenzione deve essere dedicata al controllo delle materie prime utilizzate, che devono essere ben controllate attraverso analisi pertinenti e strumentazione idonea. La conoscenza del valore del diametro medio delle particelle non costituisce un requisito sufficiente per identificare una polvere e l'eventuale presenza di particelle di dimensioni nanometriche che potrebbero rendere un prodotto nocivo per la salute.

Sulla sicurezza dei nanomateriali nei cosmetici esiste una vasta letteratura scientifica che al momento non è concorde nella valutazione del rischio a causa dei diversi modelli utilizzati nei laboratori di ricerca e dei comportamenti dei nanomateriali che vanno valutati caso per caso.

L'uso di materiali ingegnerizzati ha tuttavia ormai da tempo attirato l'industria cosmetica per gli indubbi vantaggi che essi comportano, per questo i più importanti comitati scientifici dell'UE, l'FDA e anche altre Agenzie statunitensi invitano alla cautela e a valutare i rischi in rapporto ai benefici. Nell'UE il Regolamento 1223/2009/CE, a tutela dei consumatori e dell'ambiente, come richiesto dal Parlamento Europeo, prevede disposizioni specifiche per la notifica e l'etichettatura dei cosmetici contenenti nanomateriali, affinché le autorità e gli utilizzatori ne siano informati.

© RIPRODUZIONE RISERVATA

Luana Peroli, M. Cristina Tiralti, Cinzia Pagano

Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia

BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Manzo, G. Bernardini, C. Castellini, T. Renieri, N. Trevisan, M. Di Gioacchino, E. Sabbioni. *Nanotossicologia, concetti e applicazione*. Tecnologia 2,60-69 (2012).
- [2] <http://news.bbc.co.uk>
- [3] <http://www.nanotechproject.org>
- [4] EFSA, European Food Safety Authority, *Guidance on the risk assesment of the application of nano science and nanotechnology in the food and feed chain*. EFSA Journal, 9, 2140 (2011).
- [5] <http://www.airc.it/tumori/mesotelioma.asp>.
- [6] S. Karageorgi, M. A. Gates, S. E. Hankinson, I. De Vivo. *Perineal use of talcum powder and endometrial cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 19(5) 1269-1275 (2010).
- [7] D. M. Gertig, D. J. Hunter, D. Cramer, G. A. Colditz, F. E. Speizer, W. C. Willett, S. E. Hankinson. *Prospective Study of Talc Use and Ovarian Cancer*. J.N.C.I., 92(3) 249-252 (2000).
- [8] J. Wang, Y. FanLung. *Injury Induced by TiO₂ Nanoparticles Depends on Their Structural Features: Size, Shape, Crystal Phases, and Surface Coating*. Int. J. Mol. Sci. 15, 22258-22278 (2014).
- [9] A. Albanese, P. S. Tang, W. C.W. Chan. *The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems*. Annual Review of Biomedical Engineering. 14, 1-16 (2012).
- [10] A. Bulgarelli. *Filtri solari di nanoparticelle: sono sicuri?* Kosmetika 4, 56-59 (2016).
- [11] X. Feng, A. Chen, Y. Zhang, J. Wang, L. Shao, L. Wei. *Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles*. Int J Nanomedicine 10, 4321-4340 (2015).
- [12] L. Fontana, V. Leso, A. Marinaccio, G. Cenacchi, V. Papa, K. Leopold. *The effects of palladium nanoparticles on the renal function of female Wistar rats*. Nanotoxicology 9 (7), 843-851 (2015).
- [13] C.M. Powers, A.S. Bale, A.D. Kraft, S.L. Makris, J. Trecki, J. Cowden, A. Hotchkiss, P. A. Gillespie. *Developmental Neurotoxicity of Engineered Nanomaterials: Identifying Research Needs to Support Human Health Risk Assessment*. Toxicol. Sci. 134(2), 225-242 (2013).
- [14] Singh N. et al. *NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials*. Biomaterials Biomaterials, 30 (23-24) 3891-3914 (2009).
- [15] R.P.F. Schins. *Mechanism of genotoxicity of particles and fibers*. Inhalation Toxicology 14, 57-78 (2002).
- [16] Autori Vari. *Particle Toxicology*. K. Donaldson, P. Borm Editori (CRC Press) New York (2006).
- [17] K.Donaldson, V. Stone, C.L.Tran, W. Kreyling, P.J. A. Borm. *Nanotoxicology*. Occup Environ Med. 61, 727-728 (2004).
- [18] B.C.Heng, X. Zhao, S. Xiong, K. Woei Ng, F.Y. Chiang Boey, J. S. C. Loo. *Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress*. Food Chem. Toxicol, 48(6) 1762-1766 (2010).
- [19] M.Ghobadian et al. *The toxicity effect of magnesium oxide nanoparticles* Adv. Environm. Biol. 8(10), 969-973 (2014).
- [20] M. Ghobadian, M. Nabiumi, K. Parivar, M. Fathi, J.Pazooki. *Toxic effects of magnesium oxide nanoparticles on early developmental and larval stages of zebrafish*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 122, 260-267 (2015).
- [21] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Eliaf, I. Lynch, T. Cedervall, K.A. Dawson. *Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts*. PNAS, 105 (38) 14265-14270 (2008).
- [22] I. Lynch, K.A. Dawson. *Protein-nanoparticle interactions*. Nanotoday, 3 40-47 (2008).
- [23] M. Mold, E. Shardlow, C. Exley. *Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations*. Scientific Reports 6, article number 31578 (2016).
- [24] E Brunelli. *Nanoparticelle sotto controllo*. Kosmetika 5, 7476-59 (2016).

A woman is shown from the side, wearing a large, light-colored straw hat with a dark band. She is applying a spray product from a white bottle to her leg. The background is a clear blue sky.

UN FILTRO SOLARE NATURALE EFFICACE ANCHE CONTRO L'IPERPIGMENTAZIONE

Ricca di beta carotene, licopene, flavonoidi e composti fenolici, la Brasiliana *Dalbergia ecastaphyllum* è un promettente filtro solare naturale, con SPF compreso tra 13 e 47. Grazie all'attività di inibizione della tirosinasi, ha un ottimo potenziale anche nel trattamento delle iper-pigmentazioni al posto di idrochinone e acido cogico

La richiesta di prodotti naturali continua a crescere e la scoperta di nuovi ingredienti funzionali, naturali al 100%, diventa fondamentale per l'industria. Per secoli la medicina tradizionale ha usato estratti di piante e composti botanici sotto forma di tè e unguenti, ma l'effetto della maggior parte di essi deve ancora essere testato.

Considerando la vastità e la diversità delle piante e delle molecole disponibili, i ricercatori hanno davanti a sé un grande potenziale di lavoro. Un gruppo di studiosi Brasiliani dell'Università federale di Recôncavo di Bahia, ha analizzato per la prima volta la pianta *Dalbergia ecastaphyllum*, scoprendo che i suoi estratti hanno attività foto-protettiva, con ottimi valori di SPF,

maggiori di quelli riportati in studi precedenti su altre piante. Nei test effettuati, il campione con la minore concentrazione di estratto, ha dimostrato un valore di SPF maggiore del valore minimo richiesto da ANVISA, Agenzia Nazionale di Sorveglianza Sanitaria del Brasile. I ricercatori hanno, inoltre, dimostrato l'attività antiossidante e scavenger dei radicali liberi e, infine, una preziosa attività inibitoria della tirosinasi, grazie alla quale è possibile regolare disordini della pigmentazione, solitamente trattati con idrochinone, acido cogico e retinoidi, sospettati di pericolosi eventi avversi, quali citotossicità e mutagenicità.

SE SI PENSA ANCHE
ALLE CONTROVERSIE
LEGATE AI FILTRI
UV TRADIZIONALI,
RITENUTI
POTENZIALMENTE
PERICOLOSI PER
L'AMBIENTE E LA
SALUTE UMANA,
LA SCOPERTA DI UN
ATTIVO NATURALE
ACQUISTA GRANDE
INTERESSE PER
LE INDUSTRIE
COSMETICHE E
FARMACEUTICHE.

Caratteristiche e composizione chimica

Dalbergia ecastaphyllum è una specie vegetale nativa del Brasile, ampiamente utilizzata dalla medicina popolare, con grande importanza ecologica ed economica, in particolare per l'apicoltura e la produzione di propoli rosso. Nel corso degli anni, le popolazioni di *D. ecastaphyllum* sono state notevolmente ridotte dell'azione dell'uomo; combustione

e deforestazione sono le cause principali. Il lavoro prodotto dall'Università di Recôncavo di Bahia, pubblicato a fine novembre del 2018 dalla rivista PLOS ONE [1], caratterizza per la prima volta estratti idro-alcolici della pianta, rivelandone il contenuto di fenoli totali, flavonoidi, carotenoidi e clorofille, nonché antiossidanti, fotoprotettivi e inibitori della tirosinasi. Foglie di *D. ecastaphyllum* sono state raccolte nelle aree pubbliche di sette comuni (tab.1) dello stato di Bahia, in Brasile. Portati in laboratorio, i campioni sono stati essiccati

in forno a corrente d'aria (40° C) per 72 ore, triturati in macina e conservati in flaconi chiusi di policarbonato, tenuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Successivamente, per preparare gli estratti, 15 grammi di ciascun campione sono stati macerati in soluzione idro-alcolica (rapporto acqua/etanolo: 3:7 v/v), sotto agitazione



Dalbergia ecastaphyllum

costante e a temperatura ambiente per 14 giorni. Al termine del tempo di macerazione, gli estratti sono stati filtrati in carta da filtro ed evaporatori rotanti (IKA RV-USA) a 40° C, fino a totale evaporazione del solvente. Gli estratti secchi sono stati conservati in tubi chiusi e tenuti a temperatura ambiente in assenza di luce.

Carotenoidi e Clorofille

A questo punto, mediante procedura convalidata in numerosi studi precedenti [2], è stata determinata la concentrazione di carotenoidi e clorofille, pigmenti naturali che forniscono protezione contro lo stress ossidativo, quindi identificati come importanti antiossidanti [3]. Il contenuto di β-carotene varia da 0,03 ± 0,01 a 0,14 ± 0,01 mg su 100 g di massa secca. Quello

TAB.1- ELENCO DEI COMUNI APPARTENENTI ALLO STATO DI BAHIA DOVE SONO STATI RACCOLTI I CAMPIONI DI D. ECASTAPHYLLUM

Sample code	Municipalities
T1	Itaparica
T2	Vera Cruz
T3	Nova Viçosa
T4	Prado
T5	Caravelas
T6	Ilhéus
T7	Canavieiras

A ciascun comune è stato assegnato un codice T. [1]
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510.t001>

TAB. 2 – COMPOSIZIONE DEI PIGMENTI ANTIOSSIDANTI CAROTENOIDI E CLOROFILLE ESPRESSE IN MG/100 G DI MASSA SECCA [1]

Sample code	Beta carotene	Lycopene	Chlorophyll a	Chlorophyll b
T1	0.14±0.01 a	0.41±0.01 b	0.66±0.01 d	0.33±0.01 bc
T2	0.08±0.01 b	0.35±0.01 cd	0.58±0.01 ef	0.28±0.03 c
T3	0.08±0.01 b	0.40±0.01 b	0.72±0.01 c	0.39±0.01 ab
T4	0.06±0.01 cb	0.36±0.01 c	0.61±0.02 ed	0.35±0.02 bc
T5	0.14±0.01 a	0.40±0.01 b	0.54±0.02 f	0.30±0.02 c
T6	0.03±0.01 c	0.33±0.01 d	0.84±0.02 b	0.39±0.03 ab
T7	0.16±0.01 a	0.50±0.01 a	0.97±0.02 a	0.41±0.02 a
p-value	3.00	3.00	3.00	3.00

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono al test di Tukey con valore p <0,05.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510.t002>

TAB. 3 - CONTENUTO TOTALE DI FENOLI E DI FLAVONOIDI NEGLI ESTRATTI IDRO-ALCOLICI DI DALBERGIA ECASTAPHYLLUM [1]

Sample code	Total Phenols (TP) (mg GAE/g dry weight)	Total Flavonoids (TFL) (mg QE/g dry weight)
T1	298 ± 4 b	11 ± 3 c
T2	336 ± 8 ab	13.2 ± 0.6 cb
T3	377 ± 10 a	19.5 ± 0.3 b
T4	302 ± 7 ab	16 ± 3 cb
T5	378 ± 10 a	19 ± 3 b
T6	337 ± 4 ab	28 ± 2 a
T7	351 ± 4 ab	13 ± 3 cb
p-value	3.00	3.00

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono al test di Tukey con valore $p < 0,05$.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510.t003>

di licopene è compreso tra $0,33 \pm 0,01$ e $0,50 \pm 0,01$ mg, e il campione T7 vanta la concentrazione maggiore, mentre T1, T3 e T5, vantano concentrazioni intermedie e statisticamente simili. La clorofilla *a* è risultata più abbondante, specialmente nel campione T7, dove il valore medio è superiore a $0,97 \pm 0,02$ mg su100 g di massa secca. Riguardo la clorofilla *b*, i campioni T3, T6 e T7 vantano il contenuto maggiore (tab.2).

Fenoli e Flavonoidi

I ricercatori hanno identificato e quantificato 11 composti fenolici. Dapprima è stato stimato il contenuto totale di fenoli (TP) applicando una metodica pubblicata precedentemente

[4] Le differenze tra i campioni sono risultate significative, variando da un valore minimo di TP pari a $297,89 \pm 4,54$ a un valore massimo di $378,43 \pm 10,51$ mg GAE (Gallic acid equivalent) per grammo di estratto secco. I valori maggiori si osservano nei campioni T5 e T3, rispettivamente pari a $378,43 \pm 10,51$ e $377,17 \pm 10,50$ mg GAE/g di estratto secco. A causa degli errori sperimentali ottenuti, gli altri campioni presentano valori medi statisticamente simili (tab.3). Il contenuto totale di flavonoidi (TFL) è stato stimato come descritto precedentemente da Zhishen et al. [5]. Il valore di TFL più elevato è stato osservato nel campione T6, precisamente $28,59 \pm 2,10$ espresso in mg di equivalenti di quercetina (QE) per grammo di peso secco. Tale valore differisce statisticamente dagli altri, compresi tra 10 e 20 mg di QE (tab.3). Quella dei flavonoidi è la classe numericamente più consistente dei composti fenolici. Sono considerati potenti antiossidanti idrofili capaci di agire come antimicrobici e fotorecettori e sono responsabili di importanti funzioni, come pigmentazione, protezione UV e difesa dai patogeni, oltre che azione scavenger dei radicali liberi [6]. Mediante analisi HPLC-PAD (tab.4), i ricercatori hanno identificato 11 composti fenolici, dei quali cinque appartengono al gruppo degli acidi fenolici, precisamente acido caffeico, sinapico, vanillico, protocatecuico e β -resorcilico. I primi due derivano dall'acido idrossicinnamico, gli altri dall'acido idrossibenzoico. I rimanenti sei composti fenolici identificati dallo studio brasiliano appartengono al gruppo dei flavonoidi, precisamente a quattro diverse classi: flavanoli (catechina ed

TAB.4 - COMPOSTI FENOLICI (MG/L) IN ESTRATTO IDRO-ALCOLICO DI DALBERGIA ECASTAPHYLLUM (MEDIA $\pm$ SD) MEDIANTE HPLC-PAD [1]

Compounds	Retention time (min)	Content (mg/L)						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Caffeic acid	23.775	nd	nd	0.26 ± 0.01	0.29 ± 0.01	nd	nd	nd
Catechin	17.35	12.49 ± 0.62	6.62 ± 0.33	28.03 ± 1.40	19.95 ± 1.0	1.56 ± 0.08	3.68 ± 0.18	26.32 ± 1.32
Epicatechin	24.419	0.80 ± 0.04	0.65 ± 0.03	1.35 ± 0.07	0.91 ± 0.05	nd	nd	0.91 ± 0.05
Naringenin	54.98	0.64 ± 0.03	0.36 ± 0.02	1.39 ± 0.07	1.23 ± 0.06	0.26 ± 0.01	0.77 ± 0.04	1.39 ± 0.07
Naringin	41.85	1.99 ± 0.10	1.67 ± 0.08	1.70 ± 0.08	1.28 ± 0.06	1.28 ± 0.06	3.72 ± 0.19	3.73 ± 0.19
Protocatechuic acid	12.12	1.65 ± 0.08	1.13 ± 0.06	2.53 ± 0.13	1.37 ± 0.07	2.34 ± 0.12	1.60 ± 0.08	1.66 ± 0.08
Quercetin	58.658	nd	nd	0.93 ± 0.05	0.98 ± 0.05	nd	nd	nd
Rutin	44.68	10.49 ± 0.52	4.83 ± 0.24	18.52 ± 0.93	17.98 ± 0.9	11.04 ± 0.55	8.00 ± 0.40	20.23 ± 1.01
Sinapic acid	35.90	0.63 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.95 ± 0.05	0.94 ± 0.05	0.65 ± 0.03	0.50 ± 0.02	1.28 ± 0.06
Vanillic acid	22.88	1.35 ± 0.07	0.90 ± 0.04	2.19 ± 0.11	1.45 ± 0.07	0.99 ± 0.05	1.42 ± 0.07	2.07 ± 0.10
β -resorcylic acid	25.91	10.37 ± 0.52	6.72 ± 0.34	14.54 ± 0.73	22.12 ± 1.11	8.66 ± 0.43	8.03 ± 0.40	20.72 ± 1.04

nd: non rilevabile.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510.t004>

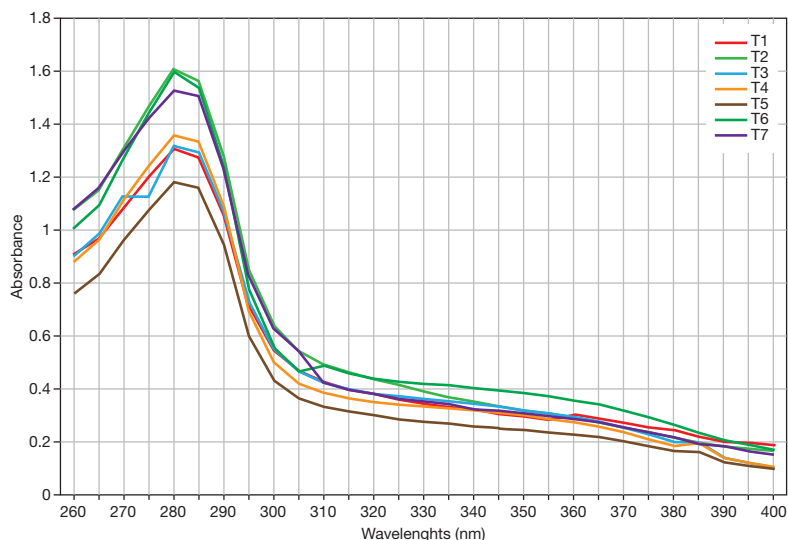


Fig.1 - Spettro di assorbimento delle lunghezze d'onda UV (da 260 a 400 nm) utile a valutare l'estratto idro-alcolico di Dalbergia ecastaphyllum (1000 µg / mL). [1]

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510.g001>

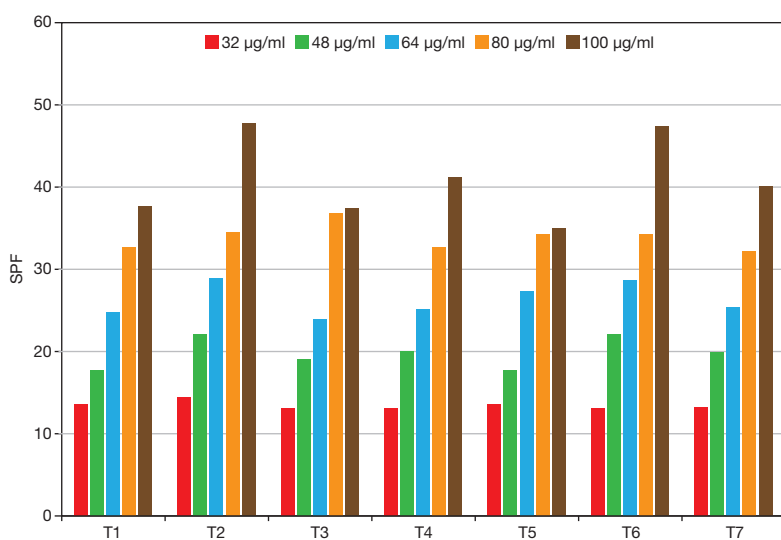


Fig.2 - Fattore di protezione solare (SPF) degli estratti idro-alcolici di Dalbergia ecastaphyllum [1]

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510.g002>

epicatechina), flavonoli (quercentina), flavanoni (naringina e naringenina) e flavoni (rutina). La catechina rappresenta il più abbondante composto fenolico rilevato, con una concentrazione minima di $1,56 \pm 0,08$ mg/L e una massima di $28,03 \pm 1,40$, seguono la rutina (da $4,83 \pm 0,24$ a $20,23 \pm 1,01$ mg/L) e l'acido β -resorcilico (da $6,72 \pm 0,34$ a $22,12 \pm 1,11$ mg/L). Le variazioni nel contenuto di composto fenolico osservato nell'estratto delle foglie di *D. ecastaphyllum*,

possono essere attribuite all'origine del campione. Gli studiosi sottolineano che l'età delle foglie e le diverse condizioni ambientali, possono influenzare il contenuto e la biosintesi dei composti fenolici nelle foglie.

Fotoprotezione

Tra i composti fenolici delle specie vegetali, i flavonoidi sono stati ampiamente studiati e sono considerati le molecole responsabili della protezione solare [7]. Mostrano due picchi di assorbimento tra le lunghezze d'onda 240-280 e 300-550 nm [8]. Tuttavia in questo studio non è stata osservata la formazione dei due picchi caratteristici, ma la massima lunghezza d'onda di assorbimento è stata misurata a 280 nm per tutti i campioni analizzati (fig.1). Sebbene la lunghezza d'onda dell'assorbimento massimo sia uguale in tutti i campioni, gli spettri differiscono tra loro per intensità di segnale. Le differenze nei risultati dello spettro mostrano che la metodologia dipende dal profilo dei composti contenuti nell'estratto e non solo dalla concentrazione totale. Per esempio, il campione T6 è caratterizzato dal più alto contenuto di flavonoidi, ma presentava uno spettro UV con intensità di assorbimento intermedia rispetto agli altri campioni. Per determinare il fattore di protezione solare (SPF), gli estratti essiccati sono stati diluiti in etanolo, ottenendo le seguenti concentrazioni per ciascuno dei 7 campioni: 32, 48, 64, 80 e 100 µg/mL (fig.2). L'assorbimento è stato letto a una lunghezza d'onda compresa tra 290 e 320 nm. L'SPF medio è stato calcolato secondo l'equazione:

$$SPF_{\text{spectrophotometric}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times A(\lambda)$$

Dove: CF è il fattore di correzione (pari a 10); $EE(\lambda)$ è l'effetto eritematogeno della lunghezza d'onda (λ) della radiazione; $I(\lambda)$ è l'intensità della luce solare alla lunghezza d'onda λ ; $A(\lambda)$ è l'assorbimento del campione letto allo spettrofotometro in corrispondenza della lunghezza d'onda λ .

I valori SPF ottenuti variano da 13,08 a 47,80 µg / mL (fig. 2). La concentrazione di estratto più bassa (32 µg / mL) testata in tutti i campioni, ha dato valori di SPF superiori ai valori richiesti dalla legislazione [9]. I risultati ottenuti per gli estratti di *D. ecastaphyllum* hanno anche mostrato valori di SPF più alti rispetto a quelli riportati in studi precedenti da altre piante. Per esempio, è stato dimostrato che gli estratti alcolici di *Marsetia taxifolia* (100 µg / mL), vantano SPF inferiore a 10 [10], gli estratti alcolici di *Encholirium spectabile* (100 mg / L), inferiore a 8 [11]; e, infine, negli estratti di *Potentilla atrosanguinea* (120 µg / mL), SPF era pari a 7,39 [12].

TAB. 5 - ATTIVITÀ INIBITORIA DELLA TIROSINASI DEGLI ESTRATTI IDRO-ALCOLICI DI DALBERGIA ECASTAPHYLLUM [1]

Sample code	Tyrosinase inhibition EC50 µg/mL
T1	184 ± 3 c
T2	472 ± 4 a
T3	172 ± 4 d
T4	148 ± 2 e
T5	125 ± 4 f
T6	202 ± 2 b
T7	463 ± 6 a
Acarbose	5.9 ± 0.3 g
p-value	3.00

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono al test di Tukey con valore $p < 0,05$.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510.t006>

Inibizione della Tirosinasi

È un enzima multifunzionale ampiamente distribuito in natura (batteri, funghi, piante e animali) [13]. Nei mammiferi il suo principale substrato è l'amminoacido tirosina che, dopo diverse reazioni chimiche ed enzimatiche, polimerizza e forma la melanina. La melanina è un biopolimero eterogeneo con un ruolo importante nella protezione contro gli effetti dannosi delle radiazioni ultraviolette sulla pelle umana, oltre a essere anche responsabile del colore della pelle, degli occhi e dei capelli. Se accumulata in eccesso, la melanina provoca disordini di iperpigmentazione come lentigini, nei, macchie senili, cloasma e melanoma. Comprendere l'attività regolatoria di questo enzima è di interesse rilevante per le industrie farmaceutiche e cosmetiche poiché i cosiddetti «inibitori della tirosinasi», quali idrochinone, acido cogico e retinoidi, sono sospettati di provocare effetti avversi come citotossicità e mutagenicità [14] e pertanto vengono usati limitatamente nell'uomo. La ricerca di nuovi agenti, in particolare di prodotti naturali che inibiscono l'attività della tirosinasi, efficaci nel trattamento di iperpigmentazione, è di massima importanza. I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che gli estratti di *D. ecastaphyllum* inibiscono l'attività della tirosinasi (tab. 5). L'inibizione più pronunciata è stata osservata nel campione T5 in virtù del profilo dei composti fenolici presenti nella sua composizione e non in base alla loro concentrazione totale. I ricercatori hanno

TAB. 6 - ANTIOSSIDANTI IDROFILI E ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEGLI ESTRATTI IDRO-ALCOLICI DI DALBERGIA ECASTAPHYLLUM [1]

Sample code	Free radical scavenging (DPPH) EC 50 µg/mL	β-carotene bleaching assay (%)
T1	47.0 ± 0.8 a	22 ± 1 e
T2	35.8 ± 0.9 ab	26 ± 1 d
T3	40.1 ± 0.6 ab	13 ± 1 f
T4	34.0 ± 1.0 abc	8 ± 2 g
T5	30.2 ± 0.8 bc	7.4 ± 0.3 g
T6	40 ± 2.0 ab	40 ± 1 c
T7	28.0 ± 0.6 bc	48 ± 1 b
Gallic acid	18 ± 3 c	3.00
Quercetin	34 ± 1 abc	
BHA		88. 3 ± 0.8 a
p-value	3.00	3.00

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono al test di Tukey con valore $p < 0,05$.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510.t005>

confrontato l'inibizione dei propri campioni con quella indotta dall'acido cogico e quest'ultimo ha dato risultati migliori. Complessivamente sono state riscontrate differenze significative nei valori di EC50 tra tutti i campioni studiati, a eccezione dei campioni T7 e T2 che hanno presentato anche valori elevati nell'attività della tirosinasi. Gli estratti di *D. ecastaphyllum* utilizzati in questo studio hanno inibito in modo più significativo l'attività della tirosinasi rispetto agli estratti di *Alchemilla vulgaris* e *Filipendula ulmaria* testate in studi precedenti [15]. L'analisi multivariata ha messo in evidenza un dato importante: tutti i campioni hanno inibito la tirosinasi (in particolare il più efficace è risultato T5, con un valore pari a 124,62 µg/mL) e si evince una significativa correlazione negativa tra il contenuto di flavonoidi e l'inibizione della tirosinasi stessa.

Attività antiossidante

I valori dell'attività antiossidante sono stati ottenuti per la stessa concentrazione di estratto (80 µg / mL) con due metodi diversi. Il primo è un test basato sulla capacità scavenging dei radicali liberi (test DPPH), consistente nel trasferimento di atomi di idrogeno. In questo caso il campione T7 ha mostrato la maggiore capacità antiossidante (indicata dai valori EC50 inferiori), pari a 28 µg/mL, seguita da T5, con 30,20 µg/mL (tab.6). I dati ottenuti mostrano che non sono state ottenute

differenze rilevanti nell'attività antiossidante dei campioni. Il secondo metodo, definito inibizione della perdita di colore del β -carotene, è invece basato sul trasferimento di elettroni. In questo caso, in ordine decrescente, l'attività antiossidante dei campioni è risultata: T5 > T4 > T3 > T1 > T2 > T6 > T7. La percentuale di inibizione valutata mediante il secondo test è inferiore rispetto a quella determinata dal metodo DPPH. L'attività antiossidante quantificata dalla prima metodologia è stata, per la maggior parte dei campioni, identica a quella ottenuta con la quercetina, usata come controllo positivo, suggerendo un elevato potenziale antiossidante degli estratti di *D. ecastaphyllum*, sebbene non comparabile con l'attività antiossidante dell'acido gallico. È interessante notare che i due metodi hanno dato risultati diversi per tutti i campioni poiché non è stata trovata alcuna correlazione tra loro, il che può essere spiegato dai diversi meccanismi chimici di reazione di queste due metodologie e, quindi, con differenti affinità di reazione ai composti chimici presenti nell'estratto. Inoltre, i singoli composti antiossidanti non riflettono necessariamente

la capacità antiossidante totale, poiché possono esistere interazioni sinergiche o antagoniste tra i diversi composti.

Conclusione

I risultati complessivi forniscono informazioni rilevanti sulle specie *Dalastagia ecastaphyllum*, indicandola come potenziale materia prima per l'industria cosmetica e farmaceutica. Tutti i campioni hanno mostrato un alto contenuto di antiossidanti lipofili e idrofili, una spiccata capacità antiossidante e attività inibitoria della tirosinasi, nonché un buon effetto protettivo, suggerendo l'uso di questi estratti per la protezione contro la radiazione ultravioletta. Questo è il primo studio che fornisce informazioni rilevanti sui fitochimici di questa specie, saranno necessari ulteriori studi per identificare i costituenti chimici della pianta, i meccanismi di azione e l'interazione tra di essi.

© RIPRODUZIONE RISERVATA

Donatella Barillaro cosmetologa

BIBLIOGRAFIA

- [1] Morais DVd, Costa MAPdC, Santa Barbara MF, Silva FdL, Moreira MM, Delerue-Mato C, et al. (2018) Antioxidant, photoprotective and inhibitory activity of tyrosinase in extracts of *Dalbergia ecastaphyllum*. *PLoS ONE* 13(11): e0207510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207510>
- [2] Nagata M, Yamashita I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Journal-Japanese Society of Food Science and Technology*. 1992; 39: 925–925.
- [3] Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 2014; 6: 466–488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466> PMID: 24473231
- [4] Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 609–614. <https://doi.org/10.1021/jf020782a> PMID: 12537430
- [5] Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*. 2005; 89: 27–36
- [6] Bubols GB, Vianna DDR, Medina-Remon A, Von Poser G, Lamuela-Raventó RM, Eifler-Lima VL, Garcia SC. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Rev. Med. Chem.* 2013; 13: 318–34. PMID: 22876957
- [7] Agati G, Azzarello E, Pollastrin S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.* 2012; 196: 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014> PMID: 23017900
- [8] Bobin MF, Raymond M, Martini MC. Propriedades de absorção UVA/UVB de produtos naturais. *Cosmet Toilett.* 1995; 7: 44–50.
- [9] Anvisa. Resolução RDC n. 30 de 1º de junho de 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União. Brasília. DF*; 2012.
- [10] Costa SCC, Detoni CB, Branco CRC, Botura MB, Branco A. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Brazilian J. Pharmacogn.* 2015; 25: 413–418.
- [11] Oliveira RG, Souza GR, Guimarães AL, de Oliveira AP, Morais ACS, da Cruz Araújo, et al. Dried extracts of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro. *Journal of Young Pharmacists*. 2013; 5: 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.jyp.2013.08.005> PMID: 24396251
- [12] Gupta VK, Kaur R, Singla R, Jaitak V. Photoprotective, antioxidant screening and new ester from dry root extracts of *Potentilla atrosanguinea* (Himalayan cinquefoil). *South African J. Bot.* 2016; 103: 49–53.
- [13] Aumeeruddy-Elalfi Z, Gurib-Fakim A, Mahomoodally MF. Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. *South African J. Bot.* 2016; 103: 89–94.
- [14] Nerya O, Vaya J, Musa R, Izrael S, Ben-Arie R, Tamir S. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003; 51: 1201–1207. <https://doi.org/10.1021/jf020935u> PMID: 12590456
- [15] Neagu E, Paun G, Albu C, Radu GL. Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2014; 52: 1–6.