



**Università
degli Studi
di Ferrara**

DOTTORATO DI RICERCA IN

"SCIENZE CHIMICHE"

CICLO XXXII

COORDINATORE Prof. Alberto Cavazzini

**APPROCCIO INTRINSECALLY DESIGNED AS SAFE ALLA
PREPARAZIONE DI FILTRI SOLARI INORGANICI ED
AGENTI ANTIACNE**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

Dottorando

Dott. Battistin Mattia

Tutori

Prof. Manfredini Stefano

Prof. Fabio Brunetta (Kalis S.r.l.)

Anni 2016/2020

*[...] **No pain, no gain.** So many [...] lessons that I apply in life I have learned from sport, and especially that one. And let me tell you, it is important to have fun in life, of course. But when you are out there partying, horsing around, someone out there at the same time is working hard. Someone is getting smarter and someone is winning. Just remember that. Now [...], if you want to win, there is absolutely no way around hard, hard work. [...]*

Arnold Schwarzenegger, *Six Rules on How to be Successful*

Ai Noni Palmiro e Rina

Nella vita ordinaria noi raramente ci rendiamo conto che riceviamo molto di più di ciò che diamo, e che è solo con la gratitudine che la vita si arricchisce.

Dietrich Bonhoeffer



Sommario

Abstract	9
Background della Ricerca.....	10
Introduzione.....	13
1. Suncare.....	13
1.1. Cute.....	15
1.2. Melanina	22
1.3. Pigmentazione della pelle	25
1.4. Radiazione UV.....	27
1.5. Risposte cutanee alla radiazione UV	28
1.6. Danni ossidativi	30
1.7. Riparazioni di nucleotidi.....	31
1.8. Cancro alla pelle	33
1.9. MC1R.....	35
1.10. Chimica della fotoprotezione	37
1.11. Sun Protection Factor (SPF).....	55
1.12. Oxisol®	59
1.13. Acido Ferulico.....	64
1.14. Acido Ellagico.....	66
1.15. Avobenzone.....	66
2. Fotocatalisi	69
2.1. Ossido di Titanio (TiO ₂)	74
2.2. Ossido di Zinco (ZnO).....	77
3. Scopo.....	80
4. Materiali e metodi	82

4.1.	Strumenti e reagenti	82
4.2.	Sintesi degli addotti	82
4.3.	Formulazioni	96
4.4.	Caratterizzazione	101
4.5.	Stabilità degli addotti: test di rilascio di Oxisol [®] dagli addotti.....	102
4.6.	Stabilità degli addotti: test di rilascio di Oxisol [®] dalle emulsioni	102
4.7.	Velocità sedimentazione	103
4.8.	Rilascio di Zn dai materiali a base di zinco (ZnO-Ox and Zn@Oxisol [®])	103
4.9.	Digestione: analisi ICP-MS	104
4.10.	Fotocatalisi	104
4.11.	Citotossicità.....	104
4.12.	Test Antiacne (Determinazione Minima Concentrazione Inibente – MIC – e Minima Concentrazione Battericida – MBC –).....	105
4.13.	Fotochemiluminescenza (PCL).....	107
4.14.	SPF (Sun Protection Factor) in vitro	108
4.15.	Viscosità delle emulsioni	111
4.16.	Densità delle emulsioni	111
4.17.	Valutazione statistica.....	111
5.	Risultati	112
5.1.	TiO ₂ @ Oxisol [®]	112
5.2.	ZnO - Oxisol [®]	122
5.3.	TiO ₂ @ Acido Ferulico	138
5.4.	ZnO @ Acido Ferulico	146
5.5.	TiO ₂ @ Acido Ellagico, ZnO @ Acido Ellagico.....	156
5.6.	n-TiO ₂ @ Avobenzone	160
5.7.	n-ZnO @ Avobenzone.....	168

6. Conclusioni.....	172
Bibliografia.....	175

Abstract

Sun exposure is a delicate equilibrium between benefits and risks for our health. Indeed, melatonin production is an important driver of human sleep/wake cycles regulated by UV radiation and the secretion of serotonin and dopamine hormones are affected by exposure to blue light. On the other hand, excessive exposure to UV radiation are linked to different acute and chronic effects on human skin as erythema (sunburn inflammation), some not always positive tanning and local or systemic immunosuppression. Furthermore, at the molecular level, UV irradiation causes DNA damage that involves the accumulation of genetic changes, as well as immune system modulation leading to the development of skin cancers. Yet, there are different negative effects associated to UV exposure and medications taking, with the potential development of skin diseases as psoriasis and vitiligo.

In 20th century skin tanning ceased to be a consequence of sun exposure during outdoor work, sport or occasional playful outdoor activities and has become an expression of a human healthy status and strenght.

So, as a consequence of the above, skin protection from sunlight and UV irradiation has become fundamental for human health and for this reason it is important to develop new and affordable skin sunscreens.

For skin protection, two different classes of sunscreens are of common use: chemical filters (organic aromatic molecules) and physical filters (inorganic molecules like TiO₂ and ZnO). Because of the growing environmental awareness the more efficient chemical organic filters led consumers to choose sunscreen products containing the second type of sunscreens, but these, unfortunately, often show a lower efficiency and some health impact: infact the photocatalytic activity of TiO₂ and ZnO could generate reactive oxygen species (ROS) on the skin leading to accelerated photoaging and other skin problems.

These evidences lead us to study a new classes of UV filters that combine the efficacy of the organic types together with the low enviromental impact of the inorganic ones: the results were successfully achieved with the synthesis of new filters obtained by inorganic coating synthesis. The coating technique boost sun protection factor (SPF) of the new filters and in the meantime decrease their toxicity. The new materials can be used in original applications for suncare and cosmetic products.

Background della Ricerca

In principio fu la luce...

Il Sole è molto più di una semplice stella. Fornendo calore, energia e luce ha reso possibile il prosperare della vita sulla Terra. Ne sono diretta dimostrazione i vegetali, i cui processi metabolici, più di ogni altro essere vivente, dipendono dalla radiazione luminosa proveniente dal Sole. È pertanto lecito sostenere che la vita sulla terra non sarebbe possibile senza la nostra stella.

Tuttavia, alla radiazione solare non sono attribuibili esclusivamente effetti benefici, numerosi ritrovamenti fossili hanno dimostrato infatti che la vita come la conosciamo non si è sviluppata fino a quando lo strato di ozono non ha ricoperto la superficie terrestre. Questo processo ha consentito di ottenere un'efficace protezione dalla radiazione UVC e pertanto di permettere alla vita di esistere non solo sotto la superficie degli oceani ma anche sulla terraferma.

La vita è diventata possibile grazie a sofisticati sistemi di fotoprotezione messi in essere dalla natura: la ionosfera (strato più esterno) che riflette i raggi X nello spazio, lo strato di ozono, che invece è responsabile della schermatura dai raggi UV corti ed il vapore acqueo presente nell'atmosfera che assorbe il grosso della radiazione IR.

Si può pertanto concludere che, dal principio, la vita sulla Terra è stata sempre strettamente connessa alla fotoprotezione¹.

L'evoluzione della dermatologia e della medicina in generale ha portato ad indagare più approfonditamente gli effetti della radiazione solare sulla salute umana. Al di là dei conosciuti effetti benefici (sintesi della vitamina D e di endorfine nella cute), queste ricerche hanno portato a classificare la radiazione UV come un "cancerogeno completo" in quanto coinvolto nella mutagenesi e nel danneggiamento non specifico con proprietà di iniziatore e promotore tumorale. La pericolosità della radiazione UV accresce ulteriormente se si pensa alla sua grande abbondanza nell'ambiente. Alla radiazione UV sono associati epidemiologicamente e molecolarmente i tre più comuni tipi di cancro alla pelle: carcinoma basocellulare, carcinoma squamoso e melanoma maligno, i quali affliggono milioni di persone ogni anno².

Le nuove scoperte in ambito medico sul ruolo della radiazione luminosa sulla nostra salute hanno dato un forte impulso alla ricerca in ambito di protezione solare, portando alla sintesi di nuove classi di filtri solari con un range di attività sempre maggiore ed arrivando a coprire efficacemente sia lo spettro UVA che quello UVB. I filtri solari si dividono genericamente in due classi: filtri chimici e filtri fisici. Entrambe, con restrizioni più o meno marcate, sono riconosciute a livello mondiale. In questi ultimi anni una sempre maggiore ricerca della naturalità dei prodotti cosmetici ha portato a rivolgere una crescente attenzione alla classe dei filtri fisici, pur essendo questi non sempre performanti come i corrispettivi filtri chimici e, spesso, anche particolarmente sgradevoli dal punto di vista cosmetologico (effetto bianco e texture impegnativa).

Esistono anche problemi di sicurezza direttamente collegati ai filtri solari essendo essi stessi soggetti all'azione della radiazione UV. Nel caso di filtri chimici il loro deterioramento porta alla formazione di radicali, mentre nel caso di filtri fisici questi diventano fotoattivi essendo dei semiconduttori e fotocatalizzatori. Anche i filtri possono quindi essere una minaccia per l'integrità cutanea se non opportunamente studiati.

Tutt'oggi tale problematica è oggetto di studio, rappresentando uno dei principali requisiti di sicurezza per i prodotti cosmetici. In particolare, il trend attuale è rappresentato dall'impiego di filtri fisici in forma nanometrica, il cui largo impiego ha indirizzato gli studi anche nei confronti del loro impatto sia a livello ambientale che in termini di salute.

Una possibile strategia risolutiva, promossa in questo lavoro di tesi, consiste nel funzionalizzare filtri fisici già dotati di ottimo profilo, quali TiO_2 e ZnO , con molecole organiche in grado di apportare un effetto SPF Boosters ed attività antiossidante, al fine di ottenere un composto sicuro e dal profilo multifunzionale.

La classe di molecole impiegate è di origine fenolica, in particolare sono stati presi in considerazione Acido Ferulico, Acido Ellagico ed acido diidrossifenil benzimidazolico (Oxisol®). Quest'ultimo appartiene ad una nuova classe di SPF booster brevettata dal gruppo di ricerca del prof. Stefano Manfredini (Università degli Studi di Ferrara): oltre a fornire l'effetto di innalzamento della protezione solare, detiene anche un'importante attività antiossidante.

Il lavoro di ricerca si è articolato in più fasi: inizialmente ci si è concentrati sulle strategie di sintesi degli addotti, a cui è seguita una caratterizzazione tramite spettroscopia IR e TGA, quest'ultima al fine di capire la stechiometria della reazione di coating. Si è quindi proceduto

e eseguendo dei test di sicurezza tramite determinazione della fotocatalisi e della citotossicità. Infine, l'efficacia è stata valutata tramite determinazione dell'effetto SPF booster, verificata mediante due metodiche: Diffey-Robson³ e ISO 24443:2012⁴, e tramite PCL per valutare il mantenimento dell'attività antiossidante. Un altro test di efficacia si è proposto di verificare il potenziale Z (DLS-ELS) e la velocità di sedimentazione, questo perché a livello formulativo è di fondamentale importanza mantenere un'ottima dispersione delle particelle.

I risultati particolarmente interessanti verificati nei test di fotocatalisi hanno spinto a verificare se la funzionalizzazione potesse stabilizzare anche altre molecole organiche presenti in commercio. Per tale ragione è stata eseguita una funzionalizzazione del TiO₂ con Avobenzone (filtro solare particolarmente noto per la sua scarsa stabilità alla radiazione UV) e verificata l'attività fotocatalitica dell'addotto così ottenuto. Il risultato è stato un semiconduttore con proprietà molto simili a quelli di un DSSC (Dye Synthesized Solar Cell), ciò ha consentito di fare chiarezza sui principi coinvolti all'interno del processo fotocatalitico degli addotti sintetizzati.

Il lavoro di ricerca di questi tre anni ha consentito di ottenere una nuova classe di filtri solari portando inoltre al deposito in data 8 Agosto 2019 di un brevetto dal nome "PRODOTTO SOLARE COMPRENDENTE UN FILTRO FISICO" riferimento n.102019000014076.

Introduzione

1. Suncare

Possiamo far combaciare l'inizio della fotoprotezione con la presa di coscienza da parte dell'uomo di cosa realmente fosse la luce. I primi studi furono intrapresi da Newton nel 1666 a Cambridge (Inghilterra) quando fece un buco nella finestra per far entrare una appropriata quantità di luce da far collidere con un prisma opportunamente costruito. Egli notò i differenti colori dell'arcobaleno. Eseguì così una seconda prova facendo collidere un fascio di luce monocromatico con un ulteriore prisma notando questa volta il mantenimento del colore della luce incidente. Convenne che la luce visibile non fosse altro che un insieme di differenti raggi luminosi⁵.

Dopo la scoperta dello spettro di luce visibile dovettero passare altri 150 anni prima che anche la frazione non visibile fosse indagata. Herschel scoprì infatti lo spettro infrarosso solo nel 1800. Egli scoprì un innalzamento della temperatura quando il suo telescopio puntava la luce rossa visibile. Attraverso un lavoro sistematico scoprì che il maggior aumento di temperatura si aveva quando veniva investigata la lunghezza d'onda superiore a quella del rosso. Vennero così scoperte le radiazioni infrarosse⁵.

La scoperta della radiazione UV non si fece attendere molto: basandosi su esperimenti precedenti condotti da Scheele in Svezia e già stati pubblicati nel 1777, il chimico-fisico tedesco Ritter nel 1801 scoprì la radiazione UV⁵.

Scheele mostrò che le strisce di carta immerse in una soluzione di cloruro d'argento diventavano nere dopo l'esposizione al sole e che ciò era più pronunciato con luce blu che con luce rossa.

Ritter notò che le strisce di carta diventavano ancora più scure quando venivano esposte a lunghezze d'onda invisibili più corte di quelle della luce blu visibile e scoprirono così lo spettro UV, che chiamò "ultravioletto"⁵.

Sebbene la scoperta dei raggi UV sia stata un passo fondamentale nell'evoluzione per la futura fotoprotezione, ci sono voluti molti anni prima che l'importanza dei raggi UV diventasse davvero chiara. Ciò era principalmente dovuto alla convinzione comune che le scottature solari fossero il risultato di danni da calore. Tale convinzione è venuta meno

quando, nel 1820, Home in Inghilterra ha esposto una delle sue mani al sole coprendo l'altra con un panno nero. Egli notò una scottatura solare sulla mano esposta, sebbene un termometro abbia registrato invece una temperatura più elevata nella mano coperta dal panno. Nel 1889, Widmark in Svezia pubblicò la prova sperimentale che le radiazioni UV causavano eritema. Dopo l'esperimento di Home e la pubblicazione di Widmark, passò del tempo prima che diventasse noto che i raggi UV inducevano scottature solari. Ancora nel 1891, infatti, il dermatologo ungherese Kaposi credeva che il calore del sole inducesse scottature e pigmentazione. Nel 1900, Finsen in Danimarca ripeté l'esperimento di Home senza sapere del suo lavoro ottenendo i medesimi risultati. Fu una ulteriore spallata al credo comune della scottatura solare indotta da calore⁵.

Durante la prima guerra mondiale, Hausser e Vahle in Germania hanno realizzato i primi studi dettagliati sullo spettro d'azione per eritema e pigmentazione per la pelle umana. Hanno dimostrato che eritema e pigmentazione dipendono dalle lunghezze d'onda della radiazione UV e che l'effetto è dovuto principalmente alle lunghezze d'onda inferiori a 320 nm. Nel 1922, pubblicarono gli spettri d'azione per l'induzione dell'eritema e della pigmentazione nella pelle umana, utilizzando un monocromatore ed una lampada al mercurio artificiale. Durante il Secondo Congresso Internazionale sulla Luce, che ebbe luogo a Copenaghen, in Danimarca, nel 1932, Coblenz propose di dividere lo spettro UV in tre regioni spettrali: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) e UVC (<280 nm)⁵.

Anche se al giorno d'oggi abbiamo molte più possibilità di proteggere la nostra pelle da danni solari a breve e lungo termine, c'è ancora un significativo margine di miglioramento, poiché la mente umana non segue sempre il modo più logico, ma piuttosto il più semplice e popolare. Il buon senso non è necessariamente la forza trainante nel comportamento umano. Ciò è particolarmente vero per quanto riguarda la fotoprotezione. Per il dermatologo, la gratificazione del successo della fotoprotezione risiede nella prevenzione delle lesioni cutanee indotte dall'esposizione al sole. Per la popolazione generale, tuttavia, la fotoprotezione potrebbe ancora essere vista come un fastidio indesiderato, un compromesso necessario per godersi la vita all'aperto e le vacanze. Ancora più importante che avere gli strumenti è l'educazione pubblica sulla fotoprotezione, che include l'uso di filtri solari. Tutti i mezzi per facilitare la fotoprotezione saranno quindi apprezzati dai dermatologi e dal pubblico in generale. Questa sarà la nostra principale sfida per il futuro.

1.1. Cute

Se la vita fosse ermeticamente chiusa, come in un bozzolo, la sopravvivenza sarebbe impossibile per un essere che dipende dal mondo esterno. Un organismo deve quindi svilupparsi in relazione all'ambiente nel quale deve vivere e con il quale deve essere in comunicazione. Così la barriera che protegge l'organismo dall'esterno, deve allo stesso tempo dire all'organismo nel suo interno quello che accade al di fuori di esso. È il perfetto bilanciamento di queste due funzioni della barriera che determina la sopravvivenza [...] (Montagna W., Celleno L. *Biologia comparativa della pelle*, in Serri F., *Trattato di dermatologia*, Piccin, Padova, 1986)

La pelle rappresenta l'organo più esteso del corpo con una superficie variabile tra i 170 ed i 200cm² ed un peso che oscilla tra i 15 ed i 17 Kg

Il suo spessore può variare da 0,5 mm nelle zone più sottili (come le palpebre) e 4-6 mm nelle zone più spesse (palmo della mano o pianta del piede). Apparentemente liscia e compatta, in realtà la superficie cutanea è caratterizzata da solchi più o meno profondi, che nel disegno d'insieme delimitano numerosi piccoli poligoni chiamati dermatoglifi. A livello di palmo della mano e del piede questi diventano marcatamente profondi e identificativi di ogni singolo individuo. La loro funzione consta nell'estensione della pelle permettendoci di compiere movimenti.

Gli annessi cutanei rappresentano una classe di costituenti di estrema importanza, i più evidenti sono i peli, i quali sono marcatamente presenti in alcune zone (cuoio capelluto, ascelle e pube), mentre totalmente assenti in altre (punte della mano e del piede). Inoltre, la superficie cutanea è districata di piccoli fori invisibili, gli sbocchi delle ghiandole sudoripare eccrine.

A livello microscopico la pelle è il risultato della sovrapposizione di tre diversi strati:

- Epidermide, cioè lo strato più superficiale, quello a contatto con l'ambiente;
- Derma, lo strato sottostante l'epidermide ed il costituente strutturale della cute;
- Ipoderma, costituito da uno strato di cellule adipose poste al di sotto del derma, svolge la funzione di giunzione tra pelle ed organi sottostanti.

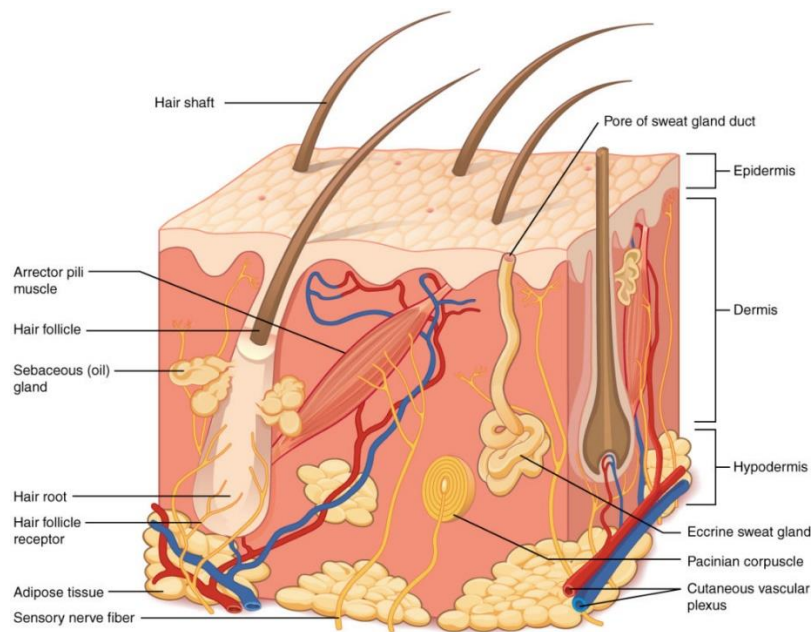


Figura 1. Schema descrittivo della struttura della cute

Tra epidermide e derma è collocata la giunzione dermo-epidermica, ondulata a causa delle tante inflessioni del derma, chiamate papille dermiche, e di estroflessioni dell'epidermide, chiamate creste epidermiche. Lungo la giunzione dermo-epidermica è collocata la membrana basale la quale è caratterizzata da membrana citoplasmatica dei cheratinociti basali e; una lamina detta lucida, una lamina detta basale ed infine strutture fibrose a contatto con il derma. All'interno della membrana basale sono evidenti strutture denominate emidesmosomi, che svolgono funzioni di ancoraggio. Le strutture fibrose al disotto della lamina basale sono di natura dermica ed assicurano la giusta adesione tra epidermide e derma⁶.

Epidermide

L'epidermide è costituita da diversi strati di cellule sovrapposte in ordine ben definito. Le cellule sono di quattro tipi:

- Cheratinociti
- Melanociti
- Cellule di Langerhans
- Cellule di Merkel⁶

Cheratinociti

Rappresentano il tipo cellulare preponderante che prende il nome dalla proteina (cheratina) prodotta da questa cellula. A mano a mano che i cheratinociti maturano, questi risalgono verso la superficie epidermica acquistando caratteristiche morfologiche differenti. Tale processo si definisce turn over cellulare.

Lo strato basale è costituito da cellule cilindriche adagiate sulla membrana basale. La loro continua divisione permette la sostituzione delle cellule superficiali perse con la desquamazione cornea. Lo strato spinoso (superiore a quello basale) è invece composto da cellule poligonali che già iniziano a produrre cheratina. Lo strato ancora superiore è denominato strato granuloso dove le file di cheratinociti si presentano più appiattiti e con “granuli” nel citoplasma, evidenti agglomerati di cheratina. Nel proseguo della loro vita i cheratinociti, oltre ad appiattirsi, perdono i loro contorni regolari diventando meno vitali e cominciando ad accumulare al loro interno abbondanti quantità di cheratina. Nasce così lo strato lucido formato da due file di cheratinociti le cui cellule sono piatte, prive di nucleo ed organi citoplasmatici. Infine, lo strato più esterno è lo strato corneo nel quale le cellule cheratiniche (corneociti) possiedono una totale assenza dell’attività metabolica, abbondanti accumuli di cheratina ed una struttura cellulare nettamente appiattita, presentandosi come “foglietti” sovrapposti. Negli strati più esterni la perdita di coesione tra cheratinociti provoca la desquamazione per essere quindi rimpiazzati da cellule provenienti dallo strato inferiore⁶.

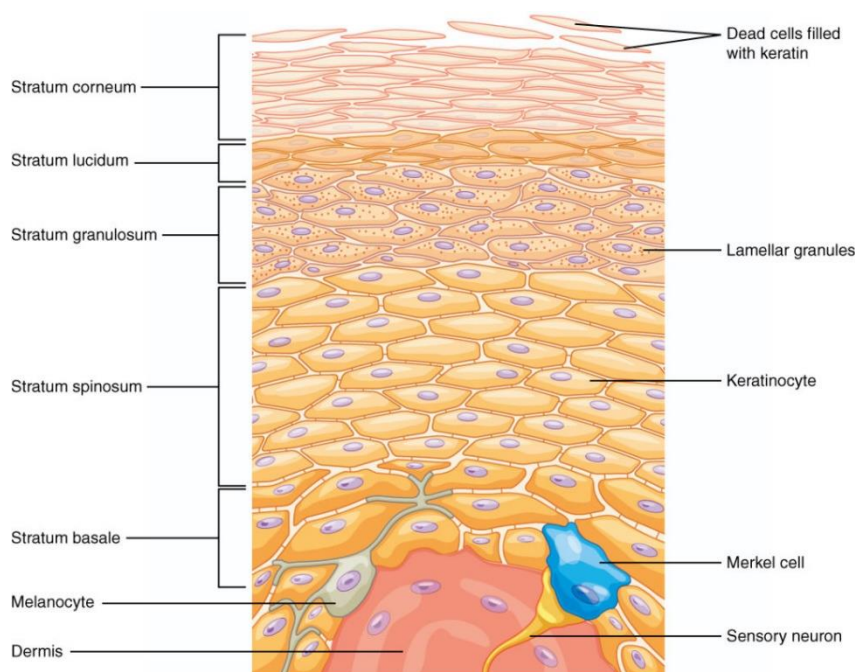


Figura 2. Struttura dell'epidermide. Sono evidenti lo strato basale, spinoso, granuloso, lucido e corneo.

Melanociti

I melanociti sono le cellule preposte alla sintesi della melanina, pigmento responsabile della colorazione della pelle, posizionati tra i cheratinociti dello strato basale in quantità rapportata al numero di cheratinociti. Mediamente se ne contano uno ogni 5-10 cheratinociti. Sono caratterizzati da filamenti chiamati dendridi che si inseriscono tra una cellula cheratinica ed un'altra degli strati basale e spinoso.

La produzione di melanina è stimolata dalla radiazione UV, questa viene quindi inglobata in corpiccioli citoplasmatici (melanosomi) che vengono riversati ai cheratinociti vicini tramite l'impiego dei dendridi. La differente colorazione tra individui dipende dal numero di melanosomi e non dal numero di melanociti (**Figura 2**). La biochimica della melanina verrà approfondita in seguito⁶.

Le cellule di Langerhans

Sono cellule dendritiche situate sopra lo strato basale. Hanno la funzione di unire gli antigeni esogeni presentandoli ai linfociti T sia della cute che dei linfonodi⁶.

Le cellule di Merkel

Sono strutture in grado di svolgere la funzione sensoriale del tatto e sono sempre associate ad una fibra nervosa. Sono più presenti in alcune zone del corpo, come i polpastrelli delle mani, la mucosa orale, le labbra ed il follicolo pilifero⁶.

Derma

Il derma è posizionato al di sotto dell'epidermide ed è il tessuto di supporto alla pelle. Tende a diminuire il suo spessore col progredire dell'età e, a differenza dell'epidermide, è riccamente innervato e vascolarizzato. È costituita principalmente da fibroblasti deputate a sintetizzare sia le fibre del derma che la sostanza fondamentale. All'interno del derma sono presenti mastociti, linfociti ed istiociti. Impegnati prevalentemente nella funzione di immunocompetenza. Le fibre prodotte dai fibroblasti sono di differente natura e svolgono diverse funzioni:

- **Fibre del collagene:** sono le più abbondanti e si presentano in fasci variamente orientati. Hanno la funzione di sostegno della struttura cornea. Sono costituite da specifici amminoacidi quali prolina, idrossiprolina, glicina, tutte posizionate a formare una struttura fibrosa.

- Fibre elastiche: formano una rete a maglie larghe la cui proteina costituente è l'elastina. La loro funzione principale è conferire alla struttura cutanea l'elasticità fondamentale per tutti i movimenti. Alla base delle smagliature cutanee sta proprio l'alterazione di queste fibre.

La sostanza fondamentale del derma è un insieme di diversi componenti che si uniscono tra loro e compattano tutte le strutture del derma. È costituita da mucopolisaccaridi acidi (glicosamminoglicani), acido ialuronico, e condroitin solfato. Unendosi a specifiche proteine, i glicosamminoglicani formano i proteoglicani. Questi hanno la capacità di legare numerose molecole di acqua proteggendo le strutture dermiche nella loro interezza⁶.

Il derma può essere suddiviso in due zone:

- Derma papillare: è situato subito al di sotto dell'epidermide ed è responsabile di apportare nutrimento a questa, grazie alla rete di capillari cutanei. Inoltre, in questo strato sono presenti le terminazioni nervose sia libere sia corpuscolate.
- Derma reticolare: è più profondo e costituito da grandi fasci di fibre collagene, paralleli alla superficie epidermica. La funzione è quella di fornire maggior sostegno alla struttura cutanea. Le cellule, la sostanza funzionale, arteriole e venule in esso contenute sono in quantità minore.

Ipoderma

L'ipoderma è situato al di sotto del derma ed è costituito da adipociti, raggruppati in lobi separati tra loro dalla presenza di zone di tessuto connettivo in cui sono presenti arteriole e venule. Sono presenti numerosi quantità di lipidi nelle cellule adipose raggruppati in un'unica goccia nel citoplasma⁶.

Vascolarizzazione cutanea

La vascolarizzazione cutanea interessa solo derma ed ipoderma ed è suddivisa in plessi, cioè intreccio di arterie, capillari e vene che scorrono parallelamente alla superficie cutanea. I principali plessi cutanei sono il plesso sottoepidermico (tra le papille dermiche) e il plesso profondo (disposto tra derma ed ipoderma)⁶.

Innervazione cutanea

Le fibre sensitive della cute si classificano in terminazioni libere e corpuscolate. Le prime sono situate più o meno profondamente nel derma arrivando fin sotto l'epidermide, hanno la

funzione di raccogliere le sensazioni dolorifiche. Le terminazioni corpuscolate sono composte da terminazioni della fibra nervosa attorno alla quale si dispongono alcune cellule che portano alla formazione di corpuscoli. Le fibre vegetative innervano il muscolo responsabile dell'erezione del pelo⁶.

Annessi cutanei

Sono principalmente peli, capelli, ghiandole sudoripare eccrine ed apocrine, ghiandole sebacee ed unghie.

Peli e capelli

Questi due annessi cutanei hanno struttura identica ma differiscono per comportamento fisiologico, soprattutto per la loro risposta agli ormoni. I peli si dividono in tre tipi, pur condividendo la stessa struttura e le stesse caratteristiche istologiche: il pelo lanugo, caratterizzato da una lanuggine particolarmente evidente nel feto, che si trasformerà in seguito in pelo terminale, ed i peli vellus, che sono invece presenti nelle donne, negli adolescenti e nel cuoio capelluto dei soggetti calvi.

Peli e capelli sono realizzati dal follicolo pilifero, un organo costituito da un'invaginazione dell'epidermide durante lo sviluppo del feto. Si divide in:

- Infundibolo, la parte che va dal punto di apertura della superficie cutanea al lo sbocco del dotto della ghiandola sebacea;
- Istmo, compreso tra dotto della ghiandola sebacea e punto di inserzione del muscolo erettore del pelo;
- Porzione inferiore, che va dal muscolo erettore del pelo al bulbo.

La vita del capello è composta da tre fasi:

- Anagen, o fase di crescita;
- Catagen, o fase di quiescenza;
- Telogen, o fase di caduta.

Ghiandole cutanee

La pelle è formata da tre tipi di ghiandole cutanee formate dell'epidermide durante lo sviluppo fetale.

Ghiandole sebacee

Sono considerate olocrine a causa della secrezione densa e ricca di sostanze organiche. Sono numerose nel volto, nel dorso e nel tronco, praticamente assenti invece nei palmi delle mani e dei piedi. La ghiandola sebacea è altresì definita acinosa-ramificata, a causa della sua particolare forma che ricorda acini d'uva; possono essere connesse, tramite il dotto escretore, alla ghiandola sebacea del follicolo pilifero, oppure aprirsi direttamente all'esterno.

Il sebo

Il sebo è il prodotto delle ghiandole sebacee e rappresenta circa il 95% dei lipidi cutanei. La sua composizione varia dalla sua produzione a quando raggiunge la superficie cutanea, questo perché i batteri contenuti nel follicolo pilifero ne modificano la composizione tramite la loro attività enzimatica. Pertanto, la composizione del sebo alla superficie sarà la seguente:

- Acidi grassi liberi	20%
- Trigliceridi	40%
- Squalene	15%
- Cere	20%
- Steroli e glicofosfolipidi	5%

La funzione del sebo è quella di protezione per la cute umana. Infatti, emulsionandosi con l'acqua presente nella sudorazione forma una pellicola in grado di proteggere la cute umana sia da sostanze chimiche che dall'azione di batteri patogeni. Inoltre, il sebo contribuisce all'emollienza della cute mantenendo l'acqua di idratazione⁶.

Ghiandole sudoripare

Sono divise in ghiandole sudoripare eccrine ed apocrine. Le prime sono più numerose e rappresentano le normali ghiandole della sudorazione e vengono definite eccrine a causa della modalità di secrezione che produce un liquido molto vicino all'acqua. Le ghiandole apocrine sono invece presenti solo in certe regioni (ascelle, regioni perigenitali, palpebre, condotto uditivo esterno,) e si differenziano da quelle eccrine per profondità, prodotto di secrezione ecc.

Le unghie

È una zona cutanea particolarmente complessa composta dai seguenti tessuti:

- Perionichio
- Eponichio

- Iponichio
- Letto ungueale
- Matrice ungueale

Nel pelo e nell'unghia, a differenza della cheratinizzazione della particolare epidermide, si stabiliscono legami chimici peculiari (sulfidrici) che determinano la differenza anatomico-strutturale tra l'epidermide ed i suoi annessi⁶.

Funzioni della pelle

Le funzioni della pelle possono essere schematizzate in **Tabella 1**⁶.

PROTETTIVA	Difesa da: <ul style="list-style-type: none"> • Agenti chimici (di tipo meccanico, chimico, biologico) • Radiazioni elettromagnetiche 	
SENSITIVA	Percezione del mondo esterno tramite la rete nervosa estremamente ricca	
TERMOREGOLAZIONE	Al caldo <ul style="list-style-type: none"> • Aumento del flusso sanguigno negli strati superficiali • Sudorazione 	Al freddo <ul style="list-style-type: none"> • Diminuzione del flusso sanguigno negli strati superficiali
EIMINAZIONE di	<ul style="list-style-type: none"> • Sostanze naturali • Farmaci • Tossine 	Tramite <ul style="list-style-type: none"> • Sudorazione • Secrezione sebacea • Desquamazione cellulare • Traspirazione
SINTESI di	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamina D • Altre sostanze funzionali 	
SECRETIVA di sostanze	<ul style="list-style-type: none"> • Antimicotiche • Antibatteriche • Idratanti 	Tramite <ul style="list-style-type: none"> • Ghiandole sebacee • Ghiandole sudoripare apocrine • Ghiandole sudoripare eccrine
BARRIERA	Consente sia l'ingresso che la fuoriuscita di sostanze	
IMMUNITARIA	Riconoscimento di agenti estranei (aperti, allergeni, antigeni) che superano lo strato corneo, da parte delle cellule di Langerhans	
COMUNICAZIONE	Tramite l'aspetto della pelle e dei suoi annessi	

Tabella 1. Schema generale descrivente le funzioni della pelle

1.2. Melanina

La quantità e il tipo di melanina epidermica sono i principali fattori che determinano la carnagione della pelle e la sensibilità ai raggi UV. La melanina è un grande bio-aggregato composto da subunità di diverse specie di pigmenti formate dall'ossidazione e dalla

ciclizzazione dell'amminoacido tirosina (**Figura 2**). Gli intermedi della melanogenesi possono avere importanti ruoli regolatori nella pelle. La melanina esiste in due forme chimiche principali: (1) eumelanina, un pigmento scuro espresso abbondantemente nella pelle di individui fortemente pigmentati, e (2) feomelanina, un pigmento solfato di colore chiaro derivante dall'incorporazione di cisteina nei precursori della melanina. L'eumelanina è molto più efficace nel bloccare i fotoni UV rispetto alla feomelanina, quindi più eumelanina è presente nella pelle, meno l'epidermide sarà permeabile ai raggi UV. Le persone di pelle chiara, che sono quasi sempre sensibili ai raggi UV e hanno un alto rischio di cancro della pelle, hanno poca eumelanina epidermica e quindi "assorbono" molta più radiazione UV rispetto a chi ha la pelle più scura. Pertanto, più chiara è la pelle, più dannosa sarà l'esposizione ai raggi UV. I livelli di feomelanina sono simili tra gli individui di pelle scura e quelli di pelle chiara, è la quantità di eumelanina epidermica che determina la carnagione della pelle, la sensibilità ai raggi UV ed il rischio di cancro. I dati suggeriscono che la feomelanina può favorire la lesione ossidativa del DNA e l'insorgenza di melanoma generando radicali liberi nei melanociti anche in assenza di raggi UV. Sotto lo schema descrivente la biosintesi della melanina².

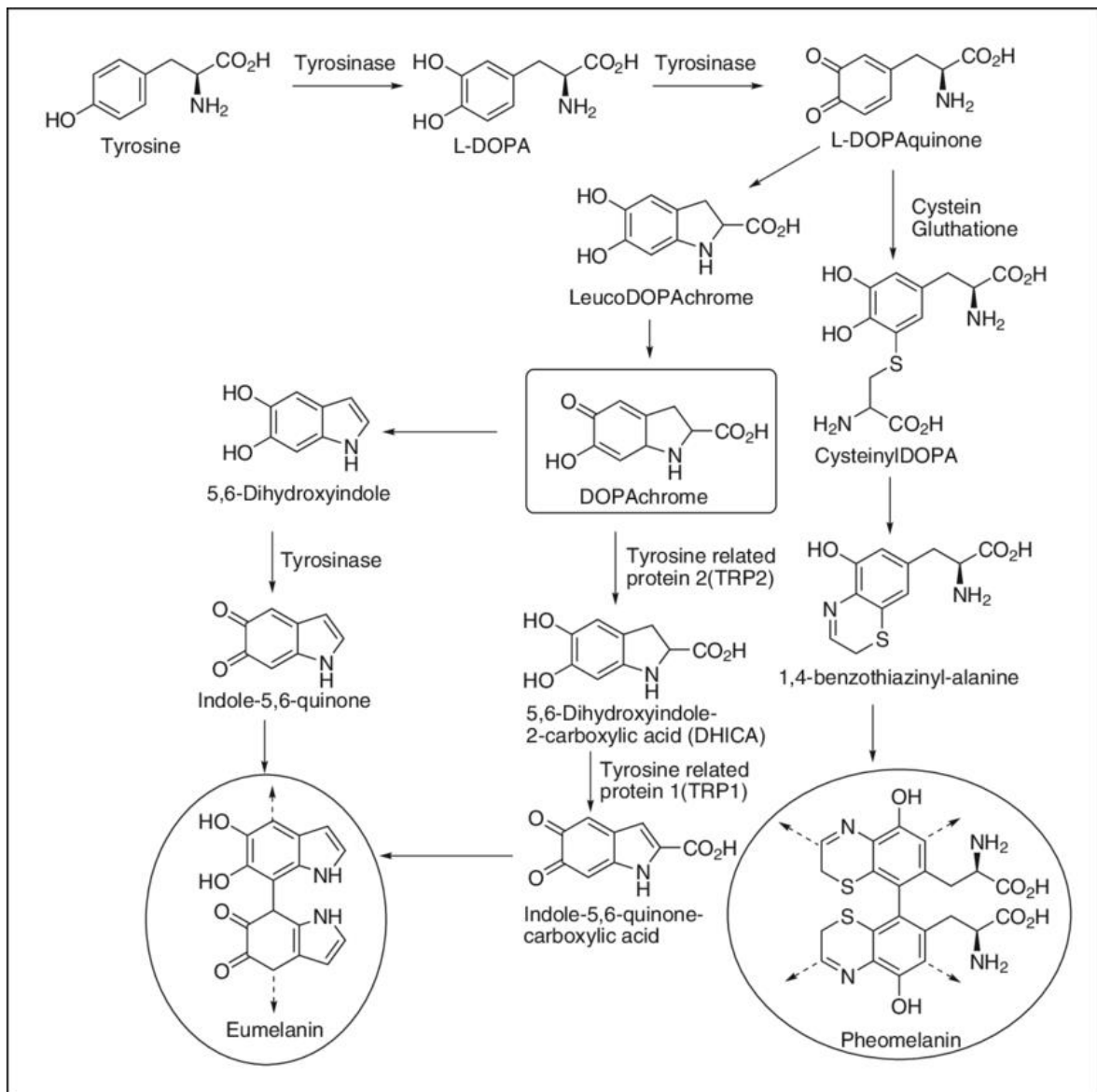


Figura 3. La melanina, un grande bio-aggregato composto da specie chimiche pigmentate, si trova in due forme principali: il pigmento marrone/nero altamente protettivo nei confronti della radiazione UV, detto eumelanina ed il pigmento invece permeabile ai raggi UV di colore rosso/biondo chiamato feomelanina. Sia l'eumelanina che la feomelanina sono derivate dall'amminoacido tirosina. La tirosinasi è l'enzima che catalizza la reazione sintetica di entrambe le specie di melanina limitandone la velocità di reazione; quando questa è difettosa causa l'albinismo. L'incorporazione di cisteina nella feomelanina provoca la ritenzione di zolfo nel pigmento, che conferisce un colore chiaro alla melanina sintetizzata la quale può contribuire a lesioni ossidative nella pelle. I segnali provenienti dall'asse rappresentato dai recettori dell'ormone stimolante i melanociti (MSH) ed il recettore MC1R è un fattore determinante per il tipo e la quantità di melanina prodotta dai melanociti nella pelle.

1.3. Pigmentazione della pelle

La carnagione della pelle è tra i più importanti parametri per la determinazione della sensibilità ai raggi UV e del rischio di cancro della pelle. La scala di Fitzpatrick è una scala semi quantitativa composta da sei fototipi che descrive il colore della pelle per carnagione, livello di melanina, risposta infiammatoria ai raggi UV e rischio di cancro (**Tabella 2**).

La dose eritematosa minima (MED) è un metodo quantitativo per determinare la quantità di radiazione UV (in particolare UVB) necessaria per indurre una scottatura sulla cute a distanza di 24-48 ore dall'esposizione determinando l'eritema (arrossamento) e l'edema (gonfiore) come endpoint. Più chiara è la pelle, più facile è che i raggi UV causino infiammazione (scottature solari). La MED, quindi è più elevata nelle persone dalla pelle scura poiché sono necessarie più radiazioni UV per bruciare la pelle ricca di eumelanina. Al contrario, le persone di carnagione chiara la cui pelle esprime prevalentemente feomelanina hanno bassi valori di MED. Il fototipo di Fitzpatrick basso è correlato al melanoma e ad altri rischi di cancro della pelle².

Fototipo di Fitzpatrick	Fenotipo	Eumelanina epidermica	Risposta cutanea alla radiazione	MED (mJ/cm²)	Rischio di cancro
I	La pelle non esposta è bianca chiara Tipicamente occhi azzurri/verdi Spesso con lentiggini Nord Europa/britannico	+/-	Si scotta sempre Escoriazioni Non si abbronzano	15-30	++++
II	La pelle non esposta è bianca Occhi blu, nocciola o castani Capelli rossi, biondi o marroni Europeo/scandinavo	+	Si scotta facilmente Escoriazioni Si abbronzano minimamente	25-40	+++ /++++
III	La pelle non esposta è chiara Occhi scuri Capelli neri Europa del centro-sud	++	Si scotta moderatamente Abilità media di abbronzarsi	30-50	+++
IV	La pelle non esposta è bruno chiaro Occhi scuri Capelli scuri Mediterraneo, Asia o regioni Latine	+++	Si scotta minimamente Si abbronzano facilmente	40-60	++
V	La pelle non esposta marrone Occhi scuri Capelli scuri India dell'est, nativi americani, latini ed africani	++++	Raramente si scottano Si abbronzano facilmente ed abbondantemente	60-90	+
VI	La pelle non esposta è nera Occhi scuri Capelli scuri Africani, aborigeni ancestrali	+++++	Non si scottano quasi mai Si abbronzano velocemente e profondamente	90-150	+/-

Tabella 2. Scala di Fitzpatrick descrivente la pigmentazione ed il rischio all'esposizione UV.

1.4. Radiazione UV

Anche grazie all'abbondanza nell'ambiente, i raggi UV contribuiscono ad una grande varietà di malattie della pelle tra cui infiammazione, invecchiamento degenerativo e cancro⁷. Storicamente l'esposizione degli esseri umani alla radiazione UV è da correlarsi alla necessità di procurarsi cibo e, generalmente, alla professione. Negli ultimi anni, tuttavia, l'esposizione ai raggi UV a “scopi ricreativi” è aumentata notevolmente a causa delle attività all'aperto e dell'abbronzatura intenzionale a fini estetici. I fotoni correlati alla radiazione UV cadono tra le lunghezze d'onda della luce visibile e della radiazione gamma. L'energia UV può essere suddivisa in componenti UV-A, -B e -C in base alle proprietà elettrofisiche: i fotoni UV-C possiedono lunghezza d'onda più brevi (100–280 nm) ed alta energia, gli UV-A mostrano invece le lunghezze d'onda maggiori (315– 400 nm) ma fotoni meno energetici ed infine gli UV-B rientrano nel mezzo delle caratteristiche appena descritte (**Figura 4**). Ogni componente di UV può esercitare una varietà di effetti su cellule, tessuti e molecole².

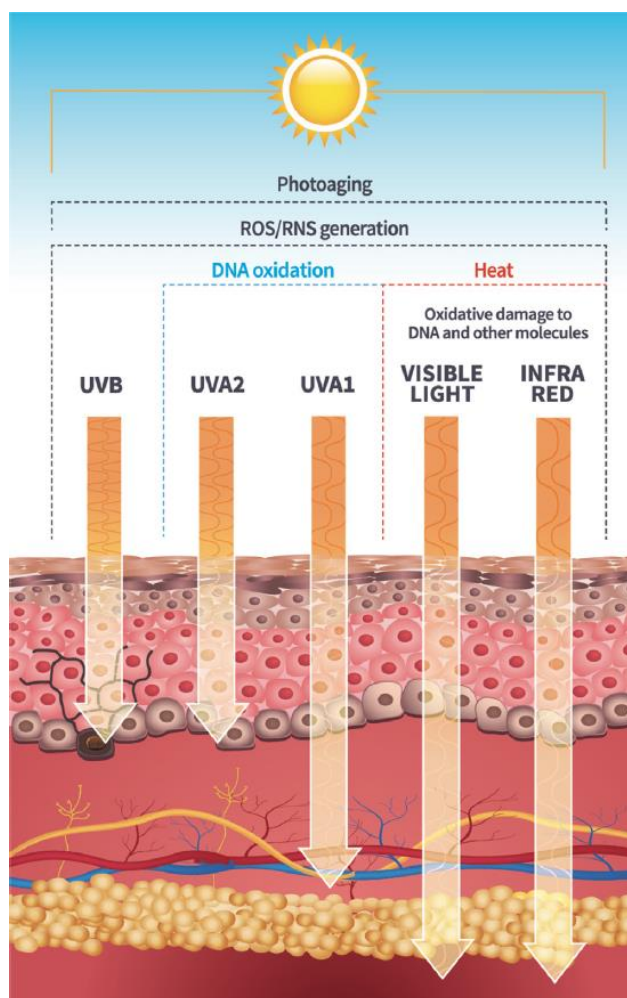


Figura 4. Radiazione incidente la cute e danni ad essa correlati. La radiazione UV solare può essere suddivisa nelle componenti UVA, UVB e UVC, grazie all'ozono atmosferico che assorbe la radiazione UVC, la luce solare ambientale è

prevalentemente UVA (90%–95%) e UVB (5%–10%). L'UV penetra nella pelle in modo dipendente dalla lunghezza d'onda. Lunghezze d'onda più lunghe (UVA) penetrano in profondità nel raggiungendo quasi interamente il derma. Al contrario la radiazione UVB è quasi completamente assorbita dall'epidermide, con una minima percentuale in grado di raggiungere il derma. L'UVA è efficace nel generare specie reattive dell'ossigeno che possono danneggiare il DNA attraverso reazioni di fotosensibilizzazione indirette. L'UVB viene assorbito direttamente dal DNA che provoca riarrangiamenti molecolari che formano i fotoprodotti specifici come dimeri di ciclobutano e fotoprodotti 6-4 (6-4PP). Mutazioni e cancro possono derivare da molte di queste modifiche al DNA.

L'esposizione ai raggi UV ambientali varia geograficamente in base all'intensità della luce. Poiché le radiazioni UV possono essere riflesse, disperse e smorzate dalle particelle atmosferiche, la dose UV ambientale varia in base alla quantità di atmosfera che la radiazione deve attraversare, rendendo le dosi UV più alte avvicinandosi all'equatore (dove la luce solare colpisce la Terra più direttamente), ad altitudini più elevate ed in condizioni di minima copertura nuvolosa o particellare. Il dosaggio UV personale dipende non solo dall'intensità della radiazione solare, ma anche dal tempo trascorso all'aperto (a livello professionale o ricreativo), dall'utilizzo di indumenti con protezione UV, dalla presenza di zone d'ombra e dall'impiego di prodotti solari. Poiché le posizioni equatoriali tendono ad essere calde e propizie ad attività all'aperto della più varia natura, le persone che vivono in questi luoghi in genere indossano meno vestiti e conseguentemente si espongono maggiormente alla luce solare ricevendo dosi UV ambientali molto più elevate rispetto alle persone che abitano in climi temperati. Non sorprende che il rischio di cancro della pelle sia maggiormente riscontrato a queste latitudini, in particolare tra le persone sensibili al sole dalla pelle chiara².

1.5. Risposte cutanee alla radiazione UV

La radiazione UV ha molti effetti sulla fisiologia della pelle, con alcune conseguenze che si verificano acutamente ed altre che si sviluppano nel tempo. Uno degli effetti acuti più evidenti dei raggi UV sulla pelle è l'induzione dell'infiammazione.

L'UVB induce una cascata di citochine, mediatori vasoattivi e neuroattivi nella pelle che insieme provocano una risposta infiammatoria e provocano "scottature". Se la dose di UV supera una soglia di danno, i cheratinociti attivano le vie apoptotiche e muoiono. Tali cheratinociti apoptotici sono noti come "cellule solari". La radiazione UV porta anche ad un aumento dello spessore epidermico, chiamato ipercheratosi. Provocando lesioni cellulari, i raggi UV inducono vie di risposta ai danni nei cheratinociti. I segnali di danno, come l'attivazione della p53, alterano profondamente la fisiologia dei cheratinociti, mediando

l'arresto del ciclo cellulare, attivando la riparazione del DNA e inducendo l'apoptosi se il danno è sufficientemente grande. Diverse ore dopo l'esposizione ai raggi UV i segnali di risposta al danno si attenuano ed i cheratinociti epidermici proliferano fortemente mediati da una varietà di fattori di crescita epidermica. L'aumentata divisione cellulare dei cheratinociti dopo l'esposizione ai raggi UV porta all'accumulo di cheratinociti epidermici che aumenta lo spessore epidermico. L'iperplasia epidermica protegge meglio la pelle dalla penetrazione dei raggi UV².

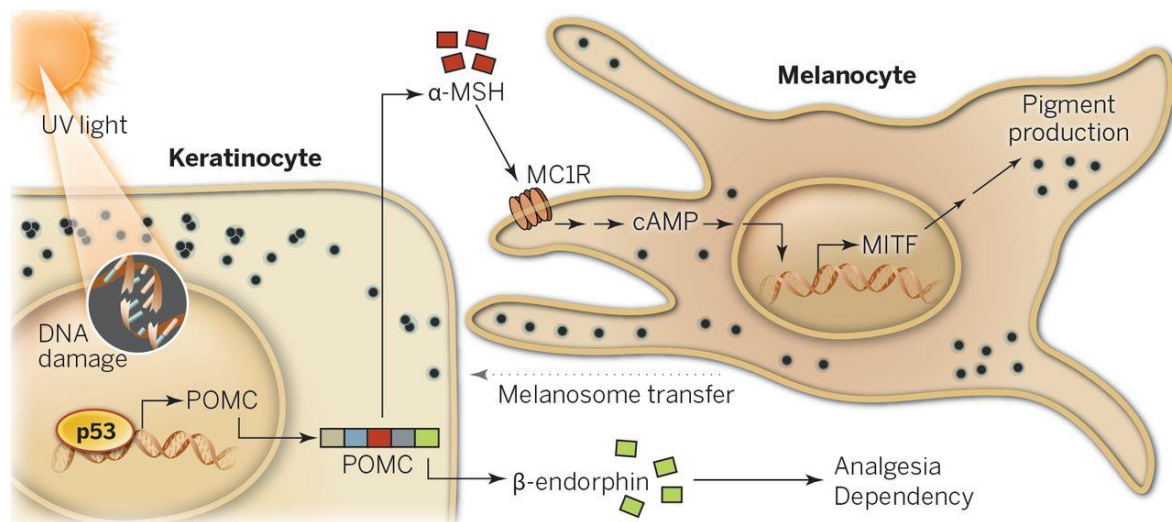


Figura 5. Meccanismi della risposta fisiologica dell'abbronzatura. Le interazioni ormonali tra cheratinociti epidermici e melanociti mediano gran parte della risposta alla melanizzazione cutanea. Il DNA e il danno cellulare nei cheratinociti regola la trascrizione del gene pro-opiomelanocortina (POMC) che codifica la produzione e la secrezione dell'ormone stimolante i melanociti (α -MSH). Il legame α -MSH al recettore della melanocortina 1 (MC1R) sui melanociti nell'epidermide basale genera il secondo cAMP del messaggero attraverso interazioni tra MC1R e adenilil ciclasi e porta all'attivazione della protein-chinasi A, dei fattori di trascrizione del CREB (cAMP response element binding) e della microftalmia (Mitf). CREB e Mitf aumentano direttamente la produzione di melanina incrementando i livelli di tirosinasi e altri enzimi biosintetici della melanina. Pertanto, la segnalazione MSH-MC1R porta a una migliore sintesi del pigmento da parte dei melanociti e all'accumulo di melanina da parte dei cheratinociti epidermici. Con questo meccanismo, la pelle è meglio protetta dai danni UV.

Insieme all'ipercheratosi epidermica si trova la melanizzazione adattativa della pelle, nota anche come abbronzatura. I raggi UV regolano la produzione e l'accumulo epidermico di pigmento di melanina nella pelle e questa importante risposta fisiologica protegge la cute dai successivi danni UV; alterazioni di questo processo sono direttamente correlate a rischi tumorali. L'oscuramento cutaneo mediato dai raggi UV è un fenomeno che si verifica in due fasi: dapprima la cute diventa più scura in virtù di cambiamenti molecolari che si verificano sulla melanina epidermica già esistente, in un secondo tempo si ha la vera e propria sovraregolazione nella sintesi della melanina e nel trasferimento ai cheratinociti. Questa inizia alcune ore o giorni dopo l'esposizione ai raggi UV.

La melanizzazione adattativa è una risposta fisiologica complessa che coinvolge più tipi di cellule della pelle interagendo in vari modi (**Figura 5**). La radiazione UV ha molti altri effetti sulla pelle, tra cui l'induzione di uno stato immotollerante o immunosoppressivo e la produzione di vitamina D mediante conversione diretta del 7-deidrocolesterolo in vitamina D3 (colecalfiferolo).

Come accennato nei precedenti paragrafi, la luce solare ambientale, per la maggior parte, è una miscela di UVA e UVB ed ognuno dei due agisce in modo distinto sulla pelle: l'UVB, ad esempio, è un potente stimolatore dell'infiammazione e della formazione di fotolesioni del DNA (come i dimeri mutagenici della timina), mentre l'UVA, per la maggior parte, induce danno ossidativo ad opera di radicali liberi al DNA e ad altre macromolecole. Entrambi, quindi, possono contribuire alla carcinogenesi attraverso meccanismi diversi².

1.6. Danni ossidativi

Oltre a promuovere la formazione di fotodimeri nel genoma, i raggi UV provocano mutazioni generando specie reattive dell'ossigeno (ROS) come anione superossido, perossido di idrogeno ed il radicale idrossile (**Figura 5**). I nucleotidi sono altamente sensibili alle lesioni dei radicali liberi e l'ossidazione delle basi nucleotidiche sfavorisce il normale accoppiamento secondo Watson-Crick, causando mutagenesi. La transversione guanina → timina, ad esempio, è una mutazione nota mediata dai ROS: l'ossidazione della guanina in posizione 8 porta alla formazione di 8-idrossi-2'-desossiguanina (8-OHdG) la quale ha maggior propensione ad accoppiarsi con un'adenina invece della citosina portando ad una mutazione di una coppia G/C con una coppia A/T. Tali mutazioni possono essere trovate in tumori isolati dalla pelle, suggerendo così che questo danno ossidativo possa essere cancerogeno. Fortunatamente esistono percorsi cellulari per inattivare le specie ossidative e per riparare il danno causato al DNA. Il base excision repair (BER) pathway è il principale mezzo molecolare con cui le cellule invertano il danno dei radicali liberi nel DNA per evitare la mutagenesi ossidativa. Questo percorso è iniziato da glicosidasi specifiche per il danno che scansionano il DNA alla ricerca di alterazioni specifiche tra cui basi deaminate, alchilate o ossidate. Il lavoro di questi enzimi è quello di promuovere il distacco della base dal filamento, lasciando così dei cosiddetti siti abasici. Il passaggio successivo è mediato da enzimi della classe delle endonucleasi, dette endonucleasi AP, le quali tagliano alle due estremità del danno lo scheletro zucchero-fosfato. Si ha quindi una rimozione dei residui di

zucchero-fosfato ed il sito lasciato libero sarà colmato dalla DNA polimerasi I, la quale sintetizza il tratto eliminato precedentemente, usando come stampo il filamento integro complementare e garantendo quindi la fedeltà della sequenza. Infine, la DNA ligasi salda il tratto neosintetizzato al resto del filamento.

Le cellule hanno anche una rete complessa e robusta di molecole antiossidanti che permette la prevenzione dei danni causati dai ROS. Il glutatione (GSH) è tra le più importanti molecole antiossidanti cellulari. È un oligopeptide composto da tre aminoacidi, cisteina, glicina e glutammina con funzioni riducenti. Nel processo il glutatione stesso si ossida, ma può essere ridotto al suo stato basale mediante glutatione reduttasi usando NADPH come donatore di elettroni ed essere riciclato. La catalasi è un altro importante enzima antiossidante che, mentre le superossido dismutasi (SOD), inattiva gli anioni superossido².

1.7. Riparazioni di nucleotidi

Come accennato, oltre alla formazione di radicali liberi, i raggi UV influenzano direttamente l'accoppiamento della base nucleotidica nel DNA⁸. Le basi pirimidiniche sono particolarmente vulnerabili all'alterazione chimica per azione della radiazione UV.

I fotoni UV a lunghezza d'onda più corta, in particolare UV-B e UV-C, scindono 5-6 doppi legami interni di pirimidine. Quando ciò si verifica tra pirimidine adiacenti, possono formarsi legami covalenti che portano all'alterazione della struttura tridimensionale della doppia elica. Le alterazioni principali sono di due tipi: i) la dimerizzazione di due basi pirimidiniche con l'ottenimento di struttura ciclobutannica ii) la formazione di fotoprodotto-6,4. Entrambi conducono ad un'alterazione della struttura tridimensionale del DNA con conseguenze altamente mutagene. Si stima che un giorno di esposizione al sole comporti fino a 105 fotolesioni indotte dai raggi UV in ogni cellula della pelle. Le fotolesioni indotte dai raggi UV compromettono la trascrizione, bloccano la replicazione del DNA e causano mutazioni di transizione caratteristiche note come " UV signature mutations ". Ne sono un esempio le mutazioni TT → CC. L'abbondanza di mutazioni di questa tipologia nei geni regolatori del cancro supporta fortemente l'azione della radiazione UV quale agente cancerogeno².

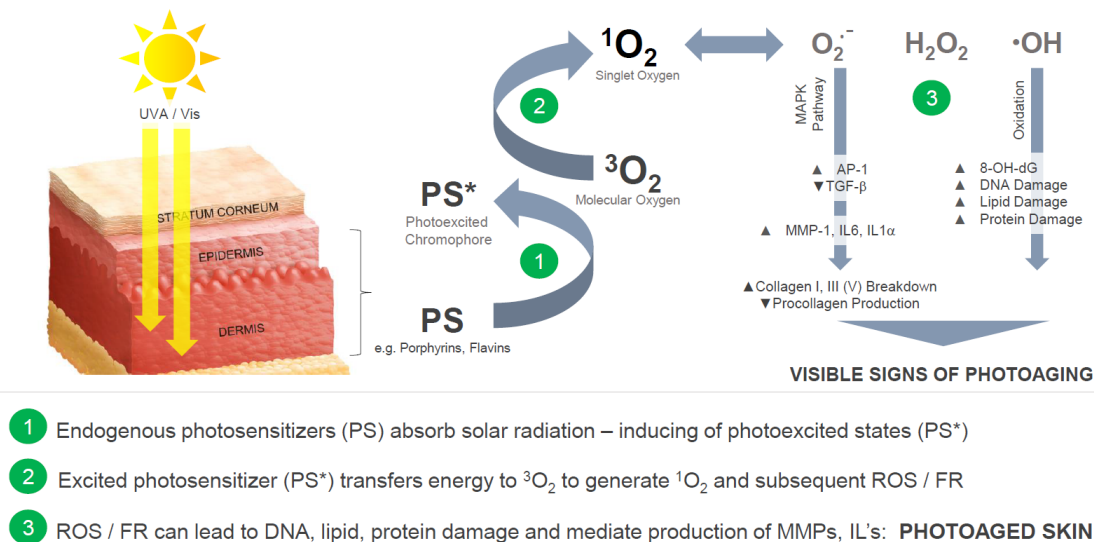


Figura 6. Meccanismo ossidativo indotto dalla radiazione UV. I fotoni interagiscono con l'ossigeno molecolare per promuovere la formazione di radicali altamente reattivi, come lo ione superossido, il perossido di idrogeno ed il radicale idrossile altamente reattivo. Questi reagiscono spontaneamente con macromolecole quali proteine, lipidi, RNA e DNA, alterando la loro struttura ed interferendo con la loro funzione. Enzimi quali la superossido dismutasi, la catalasi e la glutatione perossidasi riducono i livelli di specie ossidanti nella cellula.

La riparazione mediata dal NER è un meccanismo che consente la sostituzione del DNA danneggiato dalla radiazione UV. Al fine di comprendere l'importanza della NER nella prevenzione del cancro basta considerare i pazienti afflitti da Xeroderma Pigmentosum (XP), una rara sindrome da ipersensibilità UV causata da difetti omozigoti in una delle almeno otto proteine coinvolte nella NER: XPA, ERCC1, ERCC3 (XP-B), XPC, ERCC2 (XP-D), DDB2 (XP-E), ERCC4 (XP-F), ERCC5 (XP-G) e POLH. I pazienti con XP mostrano una profonda sensibilità ai raggi UV e sviluppano cambiamenti cutanei caratteristici tra cui anomalie pigmentarie, teleangectasie capillari e atrofia in siti anatomici esposti ai raggi UV fin dalla tenera età. Le lesioni pre-maligne ed i tumori della pelle si sviluppano con una frequenza decisamente elevata e molto prima rispetto alle persone che non ne sono afflitte. Carcinomi a cellule basali, carcinomi a cellule squamose e melanomi si sviluppano spesso prima della seconda decade di vita, decenni prima della popolazione generale. Inoltre, i tumori della pelle associati a XP dimostrano spesso le "UV signature mutations", indicando chiaramente l'importanza della NER nella resistenza al cancro. Il meccanismo NER rappresenta un'interazione orchestrata di enzimi che funzionano insieme per riparare le lesioni che alterano la struttura tridimensionale del DNA. Dopo il riconoscimento del danno ed il reclutamento di un complesso di riparazione multiproteico nel sito danneggiato, la sequenza danneggiata viene strappata e riparata dalla DNA polimerasi. Il processo è descritto in **Figura 7.**

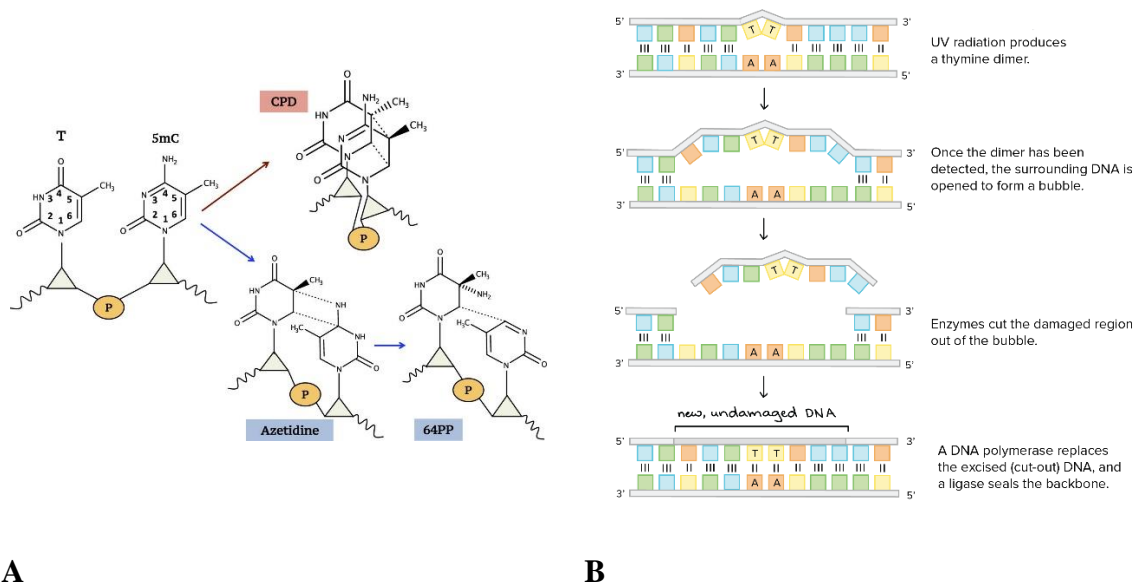


Figura 7. Dimeri di ciclobutano indotti dai raggi UV (A) e riparazione mediante via NER (Nucleotide Excision DNA Repair) (B). Il percorso NER è mediato da almeno otto enzimi che lavorano insieme per identificare le lesioni al DNA che distorcono la struttura della doppia elica, isolare la porzione danneggiata e sostituire tale regione con la sintesi del DNA diretta dal filamento complementare. La carenza di uno qualsiasi degli enzimi NER porta alla condizione clinica nota come Xeroderma Pigmentosum (XP).

Sebbene solo una manciata di fattori fondamentali sia necessaria e sufficiente per la riparazione delle lesioni del DNA indotte dai raggi UV, ci sono numerosi fattori accessori che regolano questo percorso di mantenimento del genoma².

1.8. Cancro alla pelle

I tumori della pelle sono di gran lunga i tumori maligni più comuni nell'uomo, con oltre un milione di casi diagnosticati ogni anno. Ad esempio, circa 1 americano su 5 svilupperà il cancro della pelle nella sua vita.

Rappresentano quasi 15.000 decessi e oltre tre miliardi di dollari ogni anno in spese mediche solo negli Stati Uniti. Come molti altri tumori indotti da eziologie ambientali (in questo caso radiazioni UV), l'incidenza del cancro della pelle aumenta notevolmente con l'età presumibilmente riflettendo la lunga latenza tra l'esposizione a sostanze cancerogene e la formazione di tumori. I tumori della pelle sono comunemente raggruppati in due categorie principali: i tumori della pelle non melanoma (Non Melanoma Skin Cancer) e melanoma, la cui differenza consta nella cellula di origine e nel comportamento clinico. Il rischio di cancro

della pelle è fortemente influenzato dall'esposizione ai raggi UV e dalla pigmentazione della pelle (**Figura 8**).

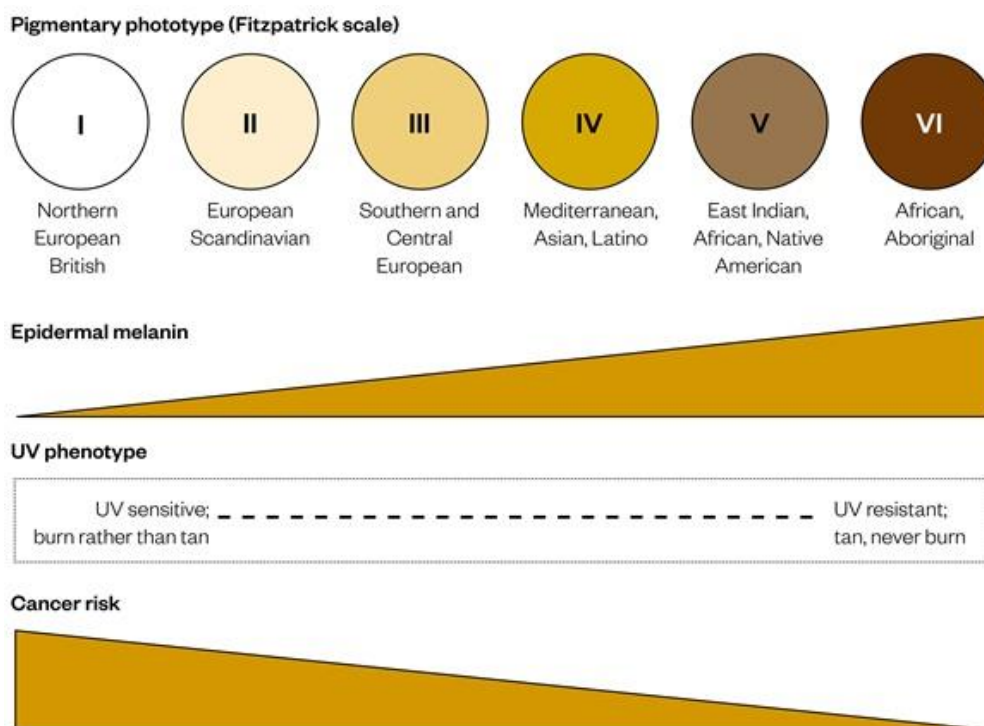


Figura 8. Influenza della pigmentazione sul rischio di cancro della pelle. Gli individui di carnagione chiara con bassi livelli di melanina nell'epidermide presentano un fenotipo sensibile ai raggi UV, tendendo a bruciarsi piuttosto che ad abbronzarsi, in seguito all'esposizione ai raggi UV. Dati recenti suggeriscono che le mutazioni che contribuiscono alla carnagione chiara e alla compromissione dell'abbronzatura, oltre a segnalare difetti nel recettore della melanocortina 1 (MC1R), possono anche essere associate ad una riparazione del DNA meno efficiente nei melanociti. Gli individui difettosi dell'MC1R non solo subiscono dosi più elevate di radiazioni UV, ma possono anche accumulare più mutazioni dall'esposizione ai raggi UV a causa di una riparazione difettosa del DNA.

Il melanoma maligno della pelle è la forma più mortale di cancro della pelle. Il melanoma è una neoplasia refrattaria al trattamento, si ritiene che derivi da melanociti epidermici ed è spesso soggetta a metastasi. La sua incidenza è in costante e significativo aumento negli ultimi decenni passando da un'incidenza di 1 americano su 1500 negli anni '30 ad 1 su 60 oggi. Il melanoma rappresenta circa i tre quarti di tutti i decessi per tumori della pelle, pari a quasi diecimila deceduti all'anno negli Stati Uniti. Questo nonostante esso rappresenti molto meno del dieci per cento di tutti i tumori della pelle. L'incidenza di questo tumore è maggiore in luoghi con un gran numero di individui di carnagione chiara che vivono in climi caldi e soleggiati soprattutto in caso di soggetti con alto numero di nevi. La cura di questo tumore è particolarmente difficoltosa a causa della sua velocità nell'entrare in metastasi: infatti, anche con i recenti progressi compiuti nella terapia mirata e nell'immunoterapia, il

melanoma rimane comunque difficile da trattare una volta che si diffonde oltre il suo sito di origine. Non è chiaro il motivo per cui l'incidenza del melanoma sia aumentata in modo così drammatico negli ultimi decenni, ma è probabilmente multifattoriale, con contributi da una maggiore esposizione ai raggi UV, fattori ambientali ereditari di rischio di cancro ed anche una migliore efficacia nella diagnosi precoce.

I tumori della pelle non melanomatosi superano di molto i melanomi per incidenza, ma fortunatamente per la maggior parte sono molto più facili da trattare e hanno una prognosi a lungo termine molto migliore. Le due forme principali, carcinoma basocellulare e spinocellulare, sono entrambe derivate da cheratinociti epidermici. Sono meno mortali del melanoma principalmente a causa della loro tendenza a rimanere confinati nel loro sito primario di malattia, il che rende la loro gestione molto più semplice. La stragrande maggioranza delle neoplasie da cheratinociti si sviluppa nelle aree della pelle più esposte ai raggi UV, come sul viso e sulle braccia e per lo più vengono trattati efficacemente solo con misure di controllo locali come resezione, microchirurgia MOHS o criochirurgia.

Si stima che i raggi UV siano causali per quasi il 65% del melanoma e il 90% dei tumori della pelle non di natura melanomatosa. Le mutazioni indotte dalla radiazione UV agiscono principalmente sul soppressore tumorale p53 nel caso del carcinoma spinocellulare².

1.9. MC1R

Il recettore della melanocortina 1 (MC1R) è direttamente coinvolto nella pigmentazione, nella risposta adattativa all'abbronzatura e nella suscettibilità al cancro della pelle. L'MC1R si trova sulla superficie dei melanociti dove si lega all'ormone stimolante gli α -melanociti (MSH) e trasmette segnali di differenziazione nella cellula attraverso l'attivazione dell'adenil ciclasi e la generazione di cAMP. La segnalazione cAMP porta all'attivazione della cascata della protein chinasi A (PKA) che, a sua volta, porta ad un aumento dei livelli e/o dell'attività di molti enzimi melanogenici per migliorare la produzione e l'esportazione di melanina da parte dei melanociti (**Figura 5**). La segnalazione MC1R riduce anche la mutagenesi mediata dai raggi UV migliorando il mantenimento del genoma nei melanociti. I polimorfismi del sistema di segnalazione MC1R si trovano comunemente tra le popolazioni di pelle chiara, sensibili al sole e soggette a tumori della pelle (come i nordeuropei). Le mutazioni MC1R più diffuse (D84E, R151C, R160W e D294H) sono comuni degli alleli RHC a causa della loro associazione con il colore dei capelli rossi e le lentiggini dimostrando una forte tendenza

a bruciare dopo l'esposizione ai raggi UV. Alle varianti RHC è associata una probabilità quattro volte maggiore di contrarre un tumore della pelle rispetto ad individui che non possiedono tale variante. Complessivamente esistono numerose prove che collocano l'MC1R come fattore determinante del rischio di cancro.

La segnalazione MC1R protegge la pelle dai danni UV con almeno due importanti meccanismi. In primo luogo, inducendo la sintesi di pigmenti nei melanociti e migliorando la produzione e l'accumulo di eumelanina nell'epidermide. La melanizzazione epidermica blocca la penetrazione dei raggi UV nella pelle, riducendone le dosi e diminuendo la mutagenesi ed il rischio di cancro. In seconda istanza, l'MC1R influenza la resistenza UV dei melanociti migliorando la riparazione del DNA e la resistenza ossidativa².

1.10. Chimica della fotoprotezione

La prevenzione delle scottature solari, del fotoinvecchiamento e del cancro della pelle è praticata nella maggior parte delle culture evitando il sole oppure coprendosi con indumenti. Questo permette un omogeneo abbattimento della radiazione UVB ed UVA mantenendo lo spettro della radiazione solare a cui la pelle umana si è adattata.

Con l'introduzione dei filtri solari UV topici il concetto di fotoprotezione ha subito una distorsione prevalentemente nei confronti degli UVB. Infatti, il concetto di SPF (Sun Protection Factor), si basa sulla capacità di prevenire l'eritema e quindi di schermare la radiazione UVB. Questo squilibrio ha favorito l'argomentazione secondo cui l'uso estensivo di creme solari può favorire piuttosto che prevenire il cancro della pelle. Già nel 1991, Diffey sosteneva la necessità di una protezione uniforme nei confronti degli UV; questo in un momento in cui l'importanza dei raggi UVA nel fotoinvecchiamento e nel tumore della pelle non era ancora tenuta in considerazione. L'importante ruolo della radiazione UVA nel fotoinvecchiamento e nella fotocarcinogenesi è oggi meglio compreso: nonostante ciò, solo pochi filtri solari offrono una protezione UV praticamente uniforme. La protezione solare ideale dovrebbe fornire una protezione UVB/UVA uniforme, in questo modo lo spettro naturale della luce solare viene attenuato senza alterarne la qualità.

Esistono altri motivi per i quali è fondamentale il raggiungimento di una omogenea protezione solare anche nei confronti della radiazione UVA. È infatti noto che gli UVA-II contribuiscono all'eritema, pertanto, una loro efficace schermatura condurrebbe a raggiungere valori elevati di SPF senza un eccessivo abbattimento della radiazione UVB. Una trasmissione più elevata della radiazione UVB permette al prodotto solare formulato di interferire meno con la produzione di vitamina D₃. È noto che molte creme solari anti-UVB sono tre volte più efficienti nel sopprimere la produzione di vitamina D₃ rispetto alla soppressione dell'eritema.

I filtri solari di nuova generazione devono pertanto seguire questi requisiti fondamentali:

1. Capacità filtrante ad ampio spettro anche nei confronti della radiazione UVA;
2. Valutazione delle prestazioni, in particolare attraverso la combinazione dei metodi SPF ed UVA-PF;
3. Rispetto degli standard stabiliti dalle autorità, in particolare per quanto riguarda la protezione UVA;
4. Gradevolezza all'uso.

Ci si concentrerà ora sul primo punto, valutando la tecnologia ad oggi disponibile ed i benefici clinici che un'adeguata protezione può apportare alla salute⁵.

Meccanismi di attenuazione: Filtri Chimici e Filtri Fisici

Nei filtri solari, si possono distinguere tre meccanismi di attenuazione UV: assorbimento, scattering e riflessione (backward scattering). Pertanto, principalmente, ci sono due modi in cui le radiazioni elettromagnetiche possono interagire con la materia: assorbimento e dispersione. Nel caso di scattering, la radiazione non ha frequenze di risonanza con transizioni energetiche della molecola, ma il dipolo elettrico della molecola o della particella oscilla con la frequenza della radiazione. I dipoli oscillanti emetteranno quindi la radiazione della frequenza originale in diverse direzioni, portando all'attenuazione della radiazione nella direzione dell'incidente. Con l'assorbimento, c'è una risonanza tra la radiazione incidente e la transizione energetica della molecola, con conseguente trasferimento di energia alla molecola.

Quando entrambi i meccanismi sono rilevanti, ad esempio, per le particelle di TiO₂ (comunemente usate come filtro solare) l'effetto totale di estinzione può essere descritto come la somma dell'assorbimento e della dispersione:

$$Extinction = Absorption + Scattering \quad (1.1)$$

La forza dell'estinzione per mole di prodotto è caratterizzata dal coefficiente di estinzione molare ϵ (L/mol·cm). La misura della capacità estinguente di un filtro è sempre correlata alla quantità del filtro, pertanto l'estinzione specifica $E_{1,1}$ sarà sempre riferita ad una soluzione (o dispersione) all'1% della molecola assorbente in esame considerando un cammino ottico di 1 cm di lunghezza. La relazione tra le due misure è data nella seguente relazione [M= massa molare (g/mol)]:

$$E_{1,1} = \epsilon [L/mol \cdot cm] \cdot \frac{10(g/L)}{M(g/mol)} \cdot 1(cm) \quad (1.2)$$

Con l'assorbimento di un fotone UV, una molecola di filtro organico passa dallo stato fondamentale elettronico (S_0) allo stato elettronico eccitato (S_n). Questa energia assorbita può essere eliminata attraverso diversi percorsi: dallo stato S_n attraverso fluorescenza (una transizione radiativa) o fotoreazioni, attraverso intersystem crossing (ISC) andando allo stadio di tripletto T_n ed infine tramite conversione interna (IC) andando allo stato S_0 , che è lo stato fondamentale elettronico ma con l'energia della molecola dissipata attraverso moti vibrazionali. Dal primo stato T_1 , l'energia può essere dissipata mediante emissione di un

fotone (fosforescenza), mediante trasferimento di energia ad altre molecole (sensibilizzazione) o tramite fotoreazioni. Dopo IC, invece, l'energia può essere dissipata dallo stato S_1 tramite l'emissione di fotoni a infrarossi (IR) (cioè il calore) oppure tramite collisioni con molecole circostanti. Poiché la costante di velocità per l'emissione di quanti IR è molto piccola, la disattivazione collisionale sarà il processo principale dopo IC, al fine di riportare la molecola allo stato S_0 (**Figura 9**). Pertanto, in termini di fotostabilità, i filtri che mostrano un alto tasso di IC sono più desiderabili.

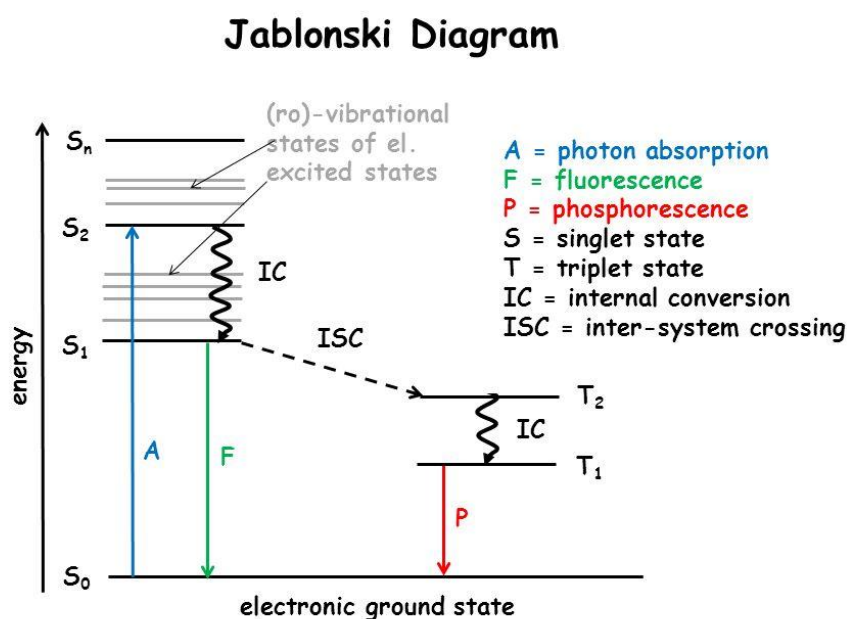


Figura 9. Diagramma di Jablonski descrivente i processi di eccitazione e diseccitazione delle molecole filtranti.

Nelle fotoreazioni, si verificano cambiamenti strutturali, che possono essere reversibili, come per le isomerizzazioni (cis/trans o cheto/enolo) o irreversibili. I cambiamenti irreversibili che portano alla decomposizione comporterebbero un filtro UV con problemi di fotoinstabilità.

Gli ossidi inorganici TiO_2 e ZnO funzionano principalmente per assorbimento delle radiazioni UV⁹, sebbene questo effetto principale sia sovrapposto da una minima parte di scattering. Sono gli unici filtri inorganici ammessi dalla regolamentazione cosmetica e vengono comunemente definiti come filtri fisici, in contrapposizione ai filtri chimici di matrice organica. I filtri fisici sono semiconduttori con un'elevata energia tra la banda di valenza e di conduzione ed il loro meccanismo di funzionamento si basa proprio su tale gap:

quando la radiazione incidente impatta una di queste particelle si ha un passaggio dell'elettrone dalla banda di valenza (VB) a quella di conduzione (CB) generando così il fenomeno dell'assorbimento (**Figura 10.a**). Nel caso dei cristalli fusi questo gap corrisponde ad un'energia che risiede alle lunghezze d'onda comprese tra 380 e 420 nm, tuttavia questa può variare con la dimensione delle particelle primarie (più piccole sono le particelle primarie, maggiore è l'energia del gap di banda). Le dimensioni delle particelle primarie di TiO₂ per applicazioni di protezione solare sono comprese tra 10 e 30 nm ma in dispersione possono formarsi aggregati con dimensioni superiori ai 10nm. Con lo ZnO sono disponibili granulometrie primarie da 10 a 200 nm, ma vengono generalmente favorite dimensioni maggiori. Il rapporto tra l'attenuazione della luce dovuta alla dispersione e all'assorbimento dipende fortemente dalla dimensione delle particelle: maggiore è la dimensione delle particelle, maggiore è il rapporto dispersione-assorbimento. Con i gradi nanometrici l'assorbimento è di gran lunga dominante⁵.

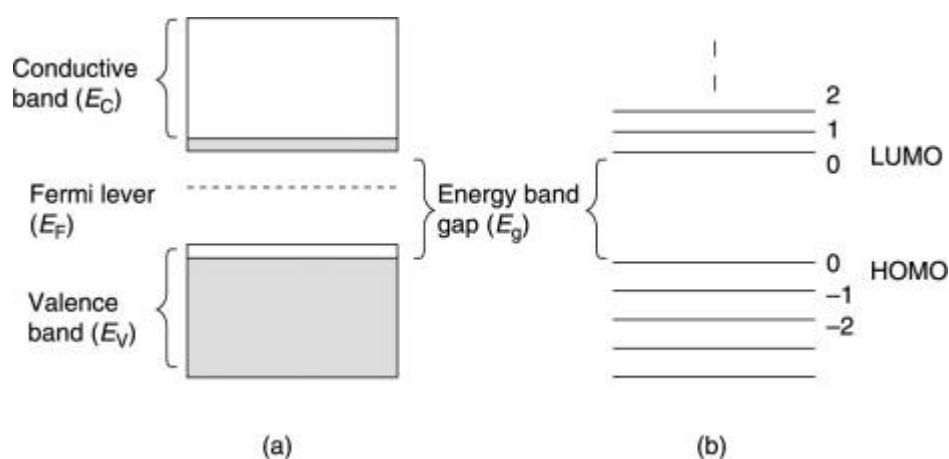


Figura 10. Meccanismo di quenching della radiazione solare di filtri fisici (a) e filtri chimici (b) a confronto.

Situazione mondiale

Non tutte le sostanze filtranti possono essere utilizzate in qualsiasi parte del mondo, ma il loro uso è disciplinato da Paese a Paese. Economicamente parlando, le regioni più importanti per la registrazione dei filtri UV sono Australia, Europa, Giappone e Stati Uniti. I filtri UVB/UVA-II sono gli unici che possono essere presenti in uno stato oleoso liquido. Il motivo risiede nel fatto che i cromofori che assorbono la luce nella gamma UVB/UVA-II sono generalmente piccoli, quindi le forze intermolecolari tendono ad essere più basse. Tuttavia, ci sono anche filtri UVB/UVA-II allo stato solido, che hanno cromofori più grandi

o contengono gruppi ionici. Tutti i filtri UVA-I o UV ad ampio spettro noti sono solidi in condizioni normali.

Due filtri, bisodisulizolo disodico e metil antranilato, hanno il loro massimo assorbimento al confine tra la regione UVA II e UVA-I.

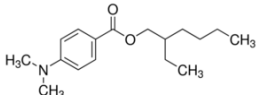
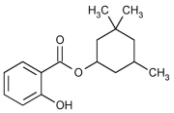
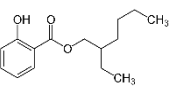
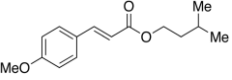
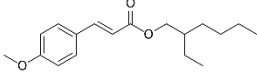
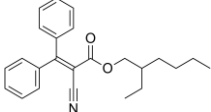
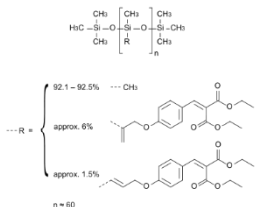
Esistono 10 filtri UVB/UVA-II comunemente usati negli Stati Uniti. Mediamente, la protezione UVA negli USA è in ritardo rispetto al resto del mondo poiché solo un filtro UVA-I (Avobenzone) ed un filtro UV ad ampio spettro (ossido di zinco) sono generalmente ammessi nelle formulazioni. In Europa e nella maggior parte del resto del mondo, sono disponibili altri due filtri UVA-I e tre filtri UV ad ampio spettro. Quattro filtri UVB/UVA-II (amiloxato, etilesil triazone, dietilesil butamido triazone e metilbezilidene canfora) e due filtri UV ad ampio spettro (bisotrizolo e bemotrizinolo) sono attualmente in attesa dell'approvazione della FDA attraverso il processo TEA (material Time and material Extent Application). Secondo la procedura TEA, la FDA può approvare ingredienti o formulazioni cosmetiche con esperienze di applicazione all'estero di almeno cinque anni in Paesi che rispecchiano la popolazione degli Stati Uniti e dopo averne verificato l'efficacia e la sicurezza. Tuttavia, da quando la procedura TEA è diventata definitiva nel 2002, nessun ingrediente è stato ancora approvato dalla FDA⁵.

Design molecolare di filtri

Negli ultimi decenni, lo sviluppo generale di nuovi attivi per la protezione solare si è spostato verso filtri a peso molecolare più elevato. La "regola del 500-Dalton", nota dallo sviluppo dei farmaci transdermici, può essere vista come un comune denominatore. La regola 500-Dalton per la penetrazione cutanea di composti chimici e farmaci afferma che quando l'obiettivo è la terapia dermatologica topica o la terapia sistemica percutanea, lo sviluppo di nuovi composti innovativi dovrebbe essere limitato a pesi molecolari inferiori a 500 Dalton. Al contrario, si potrebbe postulare una regola di 500-Dalton per lo sviluppo di attivi per la protezione solare, secondo cui lo sviluppo di nuovi composti innovativi dovrebbe essere limitato ai pesi molecolari sopra i 500 Dalton, in cui i filtri UV rimangono sulla superficie cutanea, anziché penetrare. La pelle è l'obiettivo. Lo sviluppo di nuove molecole per la protezione solare a partire dagli anni '50 ricalca proprio questo andamento, pur non essendo questa regola né una condizione necessaria né sufficiente per la sicurezza di una nuova molecola filtrante.

Le molecole organiche filtranti e non presenti sulle mercato, con i relativi spettri di assorbimento, sono sotto riportati⁵.

Current UVB and UVA-II Filters—Liquid at Room Temperature

Colipa No.	INCI—name (and abbreviation)	USAN	Structure	λ max (nm)	Registration status, maximal incorporation level (%)			
					USA	Japan	Europe	Australia
S8	Ethylhexyl dimethyl PABA (ED-PABA)	Padimate-O		311	8	10	8	8
S12	Homosalate (HMS)	Homosalate		306	15	10	10	15
S20	Ethylhexyl salicylate (EHS)	Octisalate		305	5	10	5	5
S27	Isoamyl methoxycinnamate (IMC)	Amiloxate		308	TEA	10	10	10
S28	Ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC)	Octinoxate		311	7.5	20	10	10
S32	Octocrylene (OCR)	Octocrylene		303	10	10	10	10
S74	Polysilicone-15 (BMP)	Polysilicone-15		312	-	10	10	10

Abbreviations: Colipa, European Cosmetics, Toiletry and Perfumery Trade Association; INCI, International Nomenclature of Cosmetic Ingredient; USAN, United States Adopted Name; TEA, Time and Extent Application (U.S. Food and Drug Administration application).

Tabella 3. Filtri UVB ed UVA-II.

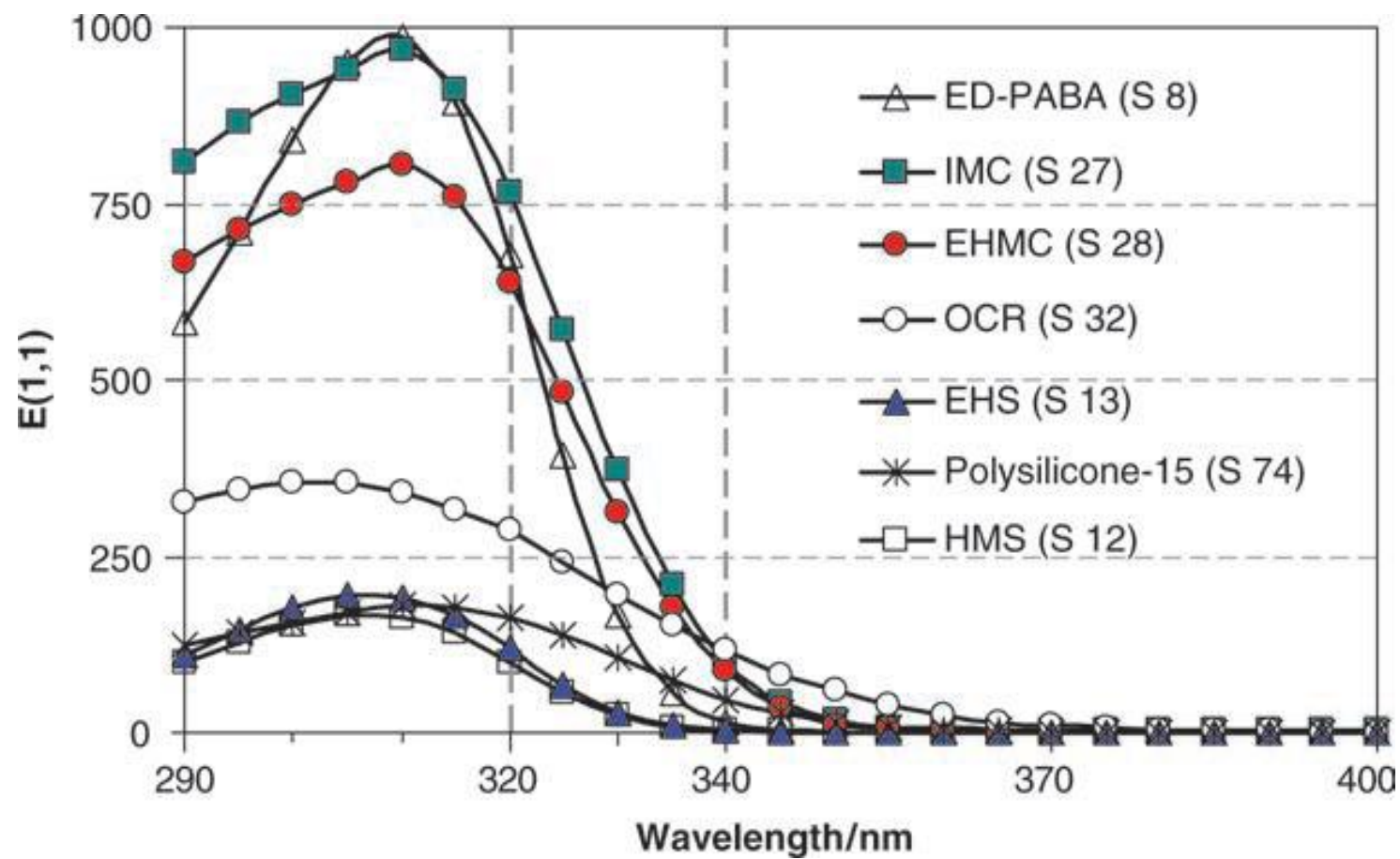


Figura 11. Spettri di assorbimento relativi ai filtri UVB/UVA-II in forma liquida (Immagine tratta da Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection).

Current UVB and UVA-II Filters—Solids								
Colipa No.	INCI—name (and abbreviation)	USAN	Structure	λ max (nm)	Registration status, maximal incorporation level (%)			
					USA	Japan	Europe	Australia
S38	Benzophenone-3 (B-3)	Oxybenzone		324	6	5	10	10
S40	Benzophenone-4 (B-4)	Sulisobenzene		324	10	10	5	10
S45	Phenyl benzimidazole sulfonic acid (PBSA)	Ensulizole		302	4	3	8	4
S60	4-Methyl benzylidene camphor (MBC)	Enzacamene		300	TEA	-	4	4
S69	Ethylhexyl triazone (EHT)	“Octyltriazone”		314	TEA	3	5	5
S78	Diethylhexyl butamido triazone (DBT)	“Dibutamidotriazone”		311	-	-	10	-

Abbreviations: Colipa, European Cosmetics, Toiletry and Perfumery Trade Association; INCI, International Nomenclature of Cosmetic Ingredient; USAN, United States Adopted Name; TEA, Time and Extent Application (U.S. Food and Drug Administration application).

Tabella 4. Filtri UVB e UVA in forma solida.

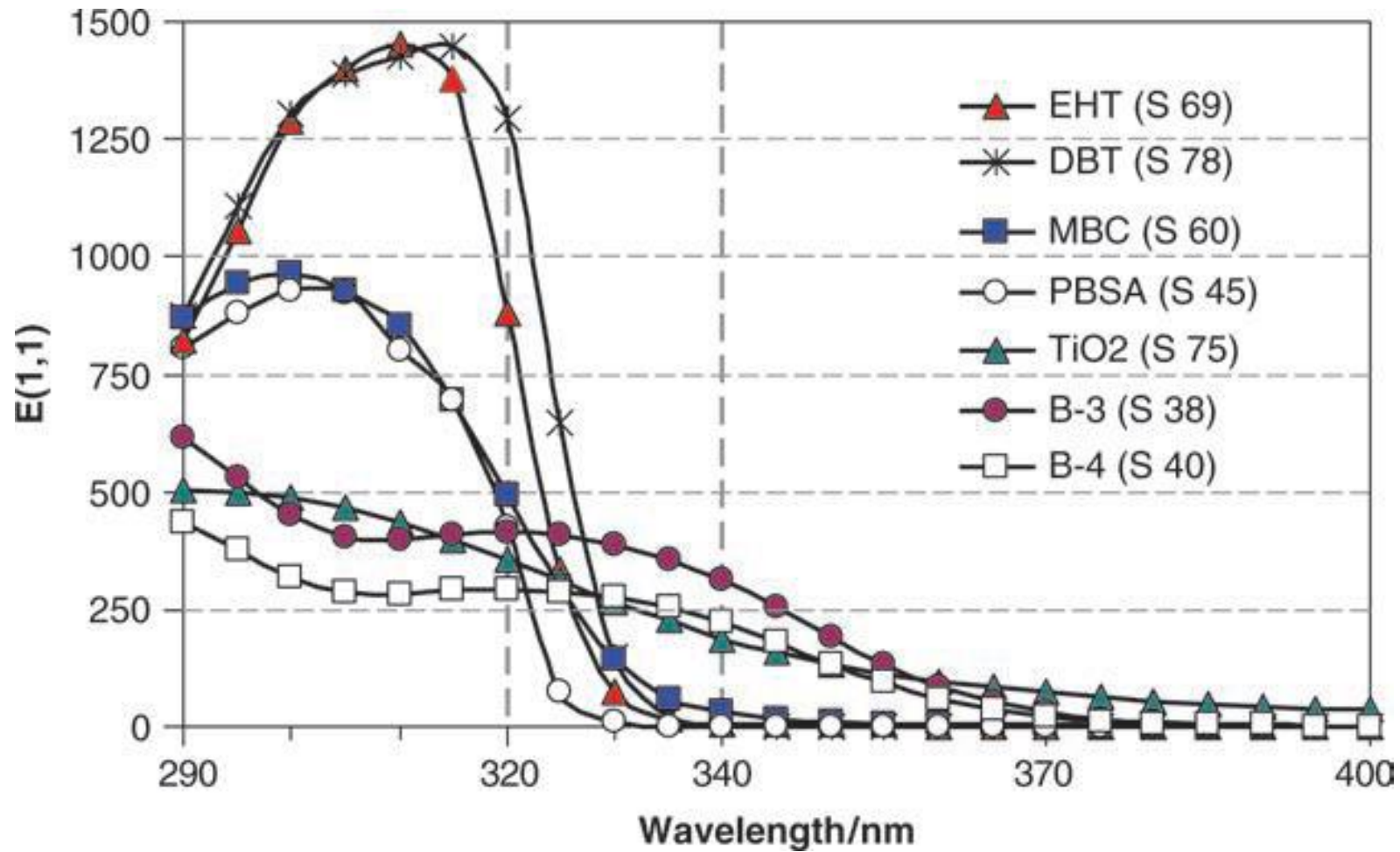
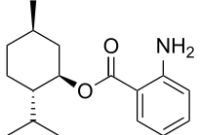
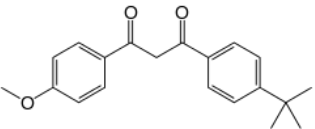
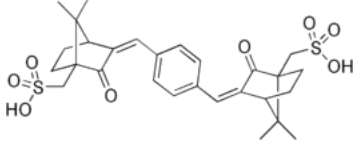
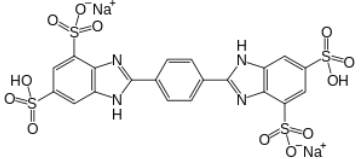
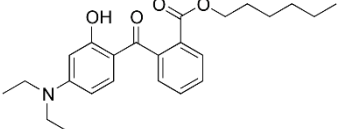


Figura 12. Spettri di assorbimento relativi ai filtri UVB/UVA-II in forma liquida (Immagine tratta da Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection).

Current UVA-I Filters (All Solids)								
Colipa No.	INCI—name (and abbreviation)	USAN	Structure	λ max (nm)	Registration status, maximal incorporation level (%)			
					USA	Japan	Europe	Australia
-	Menthyl anthranilate (MA) Meridamate	Merodimate		336	3	-	-	5
S66	Butyl methoxy dibenzoyl methane (BMDBM) Avobenzone	Avobenzone		357	3	10	5	5
S71	Terephthalidene dicamphor sulfonic acid (TDSA)	Ecamsule		345	NDA	10	10	10
S80	Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate (DPDT)	Bisdisulizole disodium		335	-	-	10	10
S83	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB)	“Aminobenzophenone”		354	-	-	10	-

Abbreviations: Colipa, European Cosmetics, Toiletry and Perfumery Trade Association; INCI, International Nomenclature of Cosmetic Ingredient; USAN, United States Adopted Name; TEA, Time and Extent Application (U.S. Food and Drug Administration application).

Tabella 5. Filtri UVA-I.

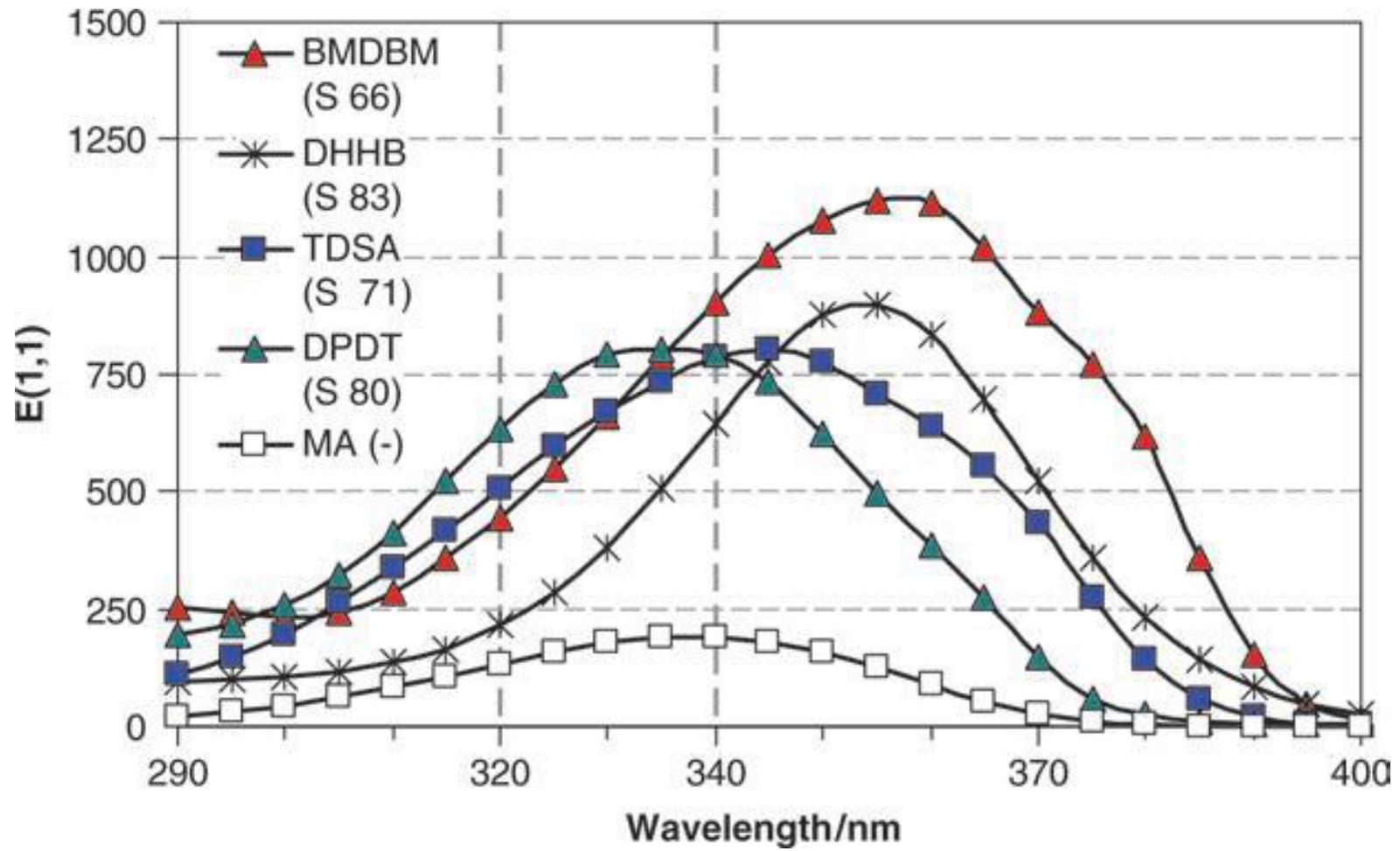
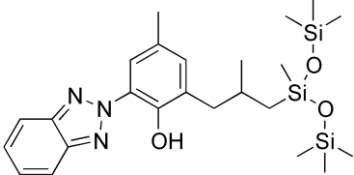
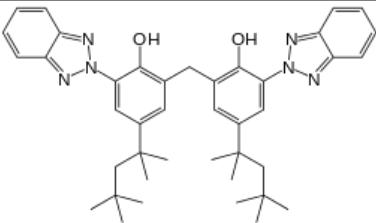
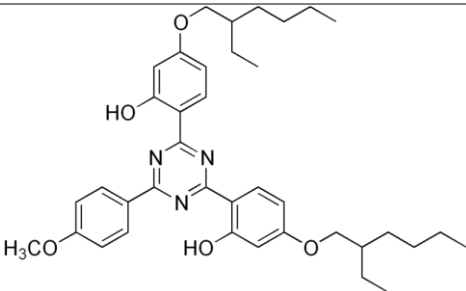


Figura 13. Spettri di assorbimento relativi ai filtri UVA-I. MA, menthyl anthranilate (Immagine tratta da Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection).

Current UVA-I Filters (All Solids)								
Colipa No.	INCI—name (and abbreviation)	USAN	Structure	λ max (nm)	Registration status, maximal incorporation level (%)			
					USA	Japan	Europe	Australia
S73	Drometrizole trisiloxane (DTS)	-		303 and 341 nm	-	10	15	15
S79	Methylene bis-benzotrazolyl tetramethyl-butylphenol (MBBT) Bisotrizole	Bisotrizole		305 and 360 nm	TEA	10	10	10
S81	Bis-ethylhexyloxy methoxyphenyl triazine (BEMT), Bemotrizinol	Bemotrizinol		310 and 343 nm	TEA	3	10	10

Abbreviations: Colipa, European Cosmetics, Toiletry and Perfumery Trade Association; INCI, International Nomenclature of Cosmetic Ingredient; USAN, United States Adopted Name; TEA, Time and Extent Application (U.S. Food and Drug Administration application).

Tabella 6. Filtri UVA-I.

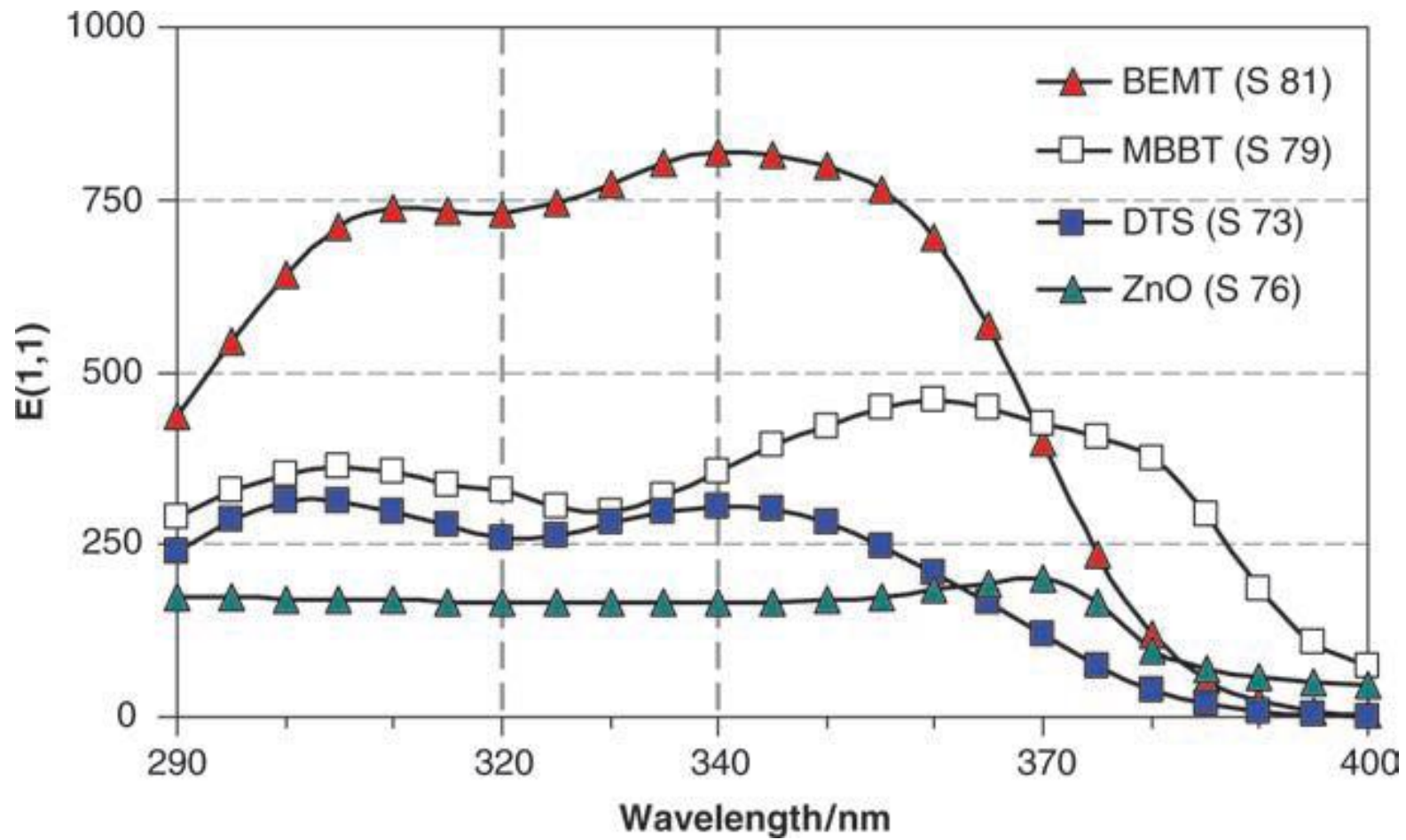


Figura 14. Spettri di assorbimento di filtri ad ampio spettro (Immagine tratta da Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection).

Performance dei filtri UV

I filtri solari, per quanto tecnologicamente avanzati, non neutralizzeranno mai completamente la radiazione incidente. Essi, infatti, si limitano ad attenuarne la trasmissione alla pelle. La radiazione UV trasmessa è fortemente influenzata dalla qualità dello spettro di assorbanza della protezione solare e, in misura minore, dalla diffusione della radiazione incidente. Tuttavia, una delle problematiche principali che limita notevolmente l'efficienza dei filtri solari riguarda l'irregolarità della cute che porta all'applicazione di un film disomogeneo.

L'effetto di protezione UV di una crema solare, pertanto, non è solamente il risultato delle proprietà e delle concentrazioni dei filtri UV impiegati, ma è anche un problema formulativo, dipendente da parametri quali la tipologia di emulsione (O/W o W/O). I filtri solari, infatti, ora sono disponibili in varie forme: creme, gel, lozioni, mousse, spray, formulati bifasici, salviette e la distribuzione del filtro UV nella fase oleosa e acquosa di una formulazione può sancire l'efficienza o meno del prodotto finito.

Il parametro di SPF è direttamente legato al tempo in cui l'individuo può esporsi al sole prima di contrarre l'eritema, fenomeno spiegato in **Figura 15**.

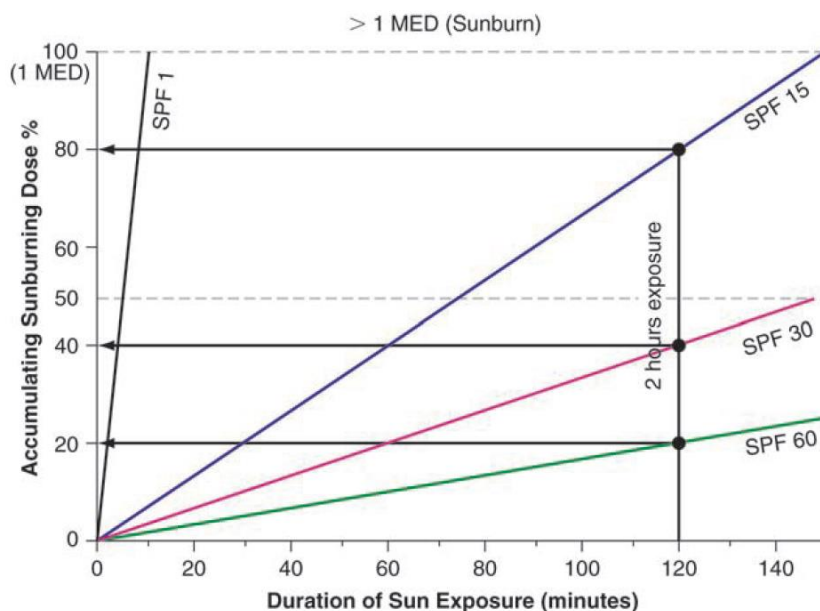


Figura 15. Prestazioni di filtri solari con SPF 15, 30 e 60 in relazione al tempo. Il MED viene raggiunto in tempi più brevi per SPF bassi.

Si nota infatti che la minima dose eritematogena (MED) viene raggiunta in meno di 10 minuti per un prodotto con SPF1, mentre basta anche una bassa protezione (SPF 15) per

allungare considerevolmente il periodo di esposizione necessario alla contrazione dell'eritema solare (150 minuti).

Un'altra problematica riguardante l'efficacia dei prodotti solari legata all'omogeneità della protezione UVA/UVB. Infatti, i filtri solari polarizzati UVB (vale a dire con un basso rapporto UVA/UVB) portano ad una curva di assorbimento concava, mentre i filtri solari uniformi nella regione UVB ed UVA presentano curve SPF/quantità convesse. Questo effetto è più pronunciato con bassi valori di SPF (SPF 10) rispetto a SPF 30. Il motivo è che qualsiasi protezione solare sopra un valore di 10 deve avere un livello minimo di protezione nella regione UVA al fine di evitare l'insorgere dell'eritema. Pertanto, i filtri solari più comuni, che forniscono un certo grado intermedio di protezione UVA, mostrano una relazione quasi lineare tra SPF e quantità applicata (**Figura 16**).

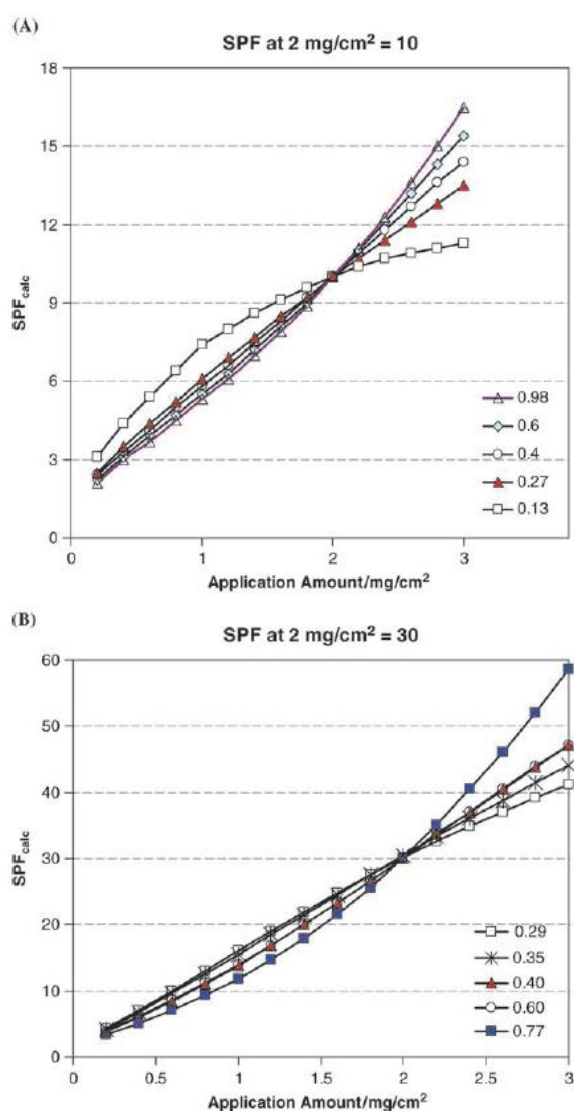


Figura 16. (A) SPF rispetto alla quantità di applicazione per i filtri solari SPF 10 e vari rapporti UVA / UVB, (B) SPF rispetto alla quantità di applicazione per i filtri solari SPF 30 e vari rapporti UVA/UVB. (Immagine tratta da *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection*).

Una relazione esponenziale (convessa) tra SPF e quantità applicata è possibile solo se il profilo di protezione è uniforme, ovvero se la protezione contro le radiazioni UVB e UVA è la stessa (indicata anche come omeostasi spettrale o filtro grigio).

La relazione tra UVA-PF e quantità di applicazione è simile a quella di SPF e quantità di applicazione, ovvero è convessa per schermi solari più uniformi, concava per schermi solari polarizzati.

In Europa, i filtri solari devono avere un rapporto minimo di 1/3 UVA-PF/SPF secondo la raccomandazione della Commissione europea (CE). Le cifre mostrano che se una crema solare soddisfa questo criterio (allo standard applicativo di 2 mg/cm²), un'applicazione di una quantità minore porterà sempre a una protezione UVA accettabile⁵.

Effetto booster

Il termine Booster è utilizzato per indicare alcune sostanze che, se inserite nella formulazione solare, possono aumentare l'efficacia schermante con un conseguente aumento dell'SPF. In particolare, è un termine utilizzato in cosmetica per evidenziare una capacità di protezione solare del cosmetico finito, superiore a quella delle sue parti.

Questa strategia formulativa, infatti, consente di creare prodotti con SPF elevato, riducendo le concentrazioni dei filtri UV tradizionali a parità di protezione con altre formulazioni. Ad esempio, in condizioni particolari e con tecniche elaborate, si può ottenere un assorbimento e una riflessione dei raggi UV pari al doppio della somma ottenuta dai singoli filtri.

Dal punto di vista chimico, l'effetto Booster può essere ottenuto da nuove molecole o da modificazioni dei filtri classici; inoltre, a seconda del meccanismo d'azione, è possibile distinguere Booster Ottici e Booster Fotochimici: i primi si basano su variazioni degli indici di rifrazione dei materiali, i secondi sono basati su interazioni con gli stati energetici dei filtri classici.

Le principali sostanze che vengono utilizzate per ottenere un effetto Booster nella protezione solare del cosmetico sono:

- *Emollienti*: hanno la capacità di disperdere i filtri in modo più efficace e stabile. Tra questi ricordiamo il C12-15 Alkyl Benzoate (ottimo solvente per solubilizzare i filtri

organici e disperdere filtri inorganici), Isopropyl Palmitate e Octyldodecyl Neopentanoate.

- *Polimeri*: i polimeri usati come Booster sono solitamente copolimeri acrilici o copolimeri del polivinilpirrolidone. Questi migliorano la tissotropia dell'emulsione, conferendole migliore distribuzione sulla pelle e il mantenimento di uno strato sottile e omogeneo a livello cutaneo. Tuttavia, i polimeri non migliorano solamente la performance applicativa del solare ma anche quella funzionale. Alcuni esempi di polimeri utilizzati sono: Triaccontanyl PVP (ottimo filmogeno con proprietà idrofobiche che dona resistenza all'acqua e allo sfregamento), Ethylhexymethoxycrylene e Dimethyl Capramide.
- *Coating di sostanze filtranti*: il rivestimento di alcuni filtri, soprattutto quelli minerali, oltre a ridurre la fotoreattività e le proprietà fotocatalitiche, può aumentare il numero di passaggi attraverso il film con indice di rifrazione diverso (effetto filtro multilayer) ma anche disperdere adeguatamente particelle per un effetto scattering e riflessione UV massimo (soprattutto per le nanoparticelle).
- *Bead (gocce, grani, sferette)*: sono sfere di silice che possono contenere o meno filtri insolubili o nanomateriali. Aumentano il diametro particellare dei filtri nano contenuti all'interno, riducendone così la loro fotoreattività.
- *Hollow-bolle, sfere cave*: si tratta di microsfeere cave, di diametro > 200 nm, che funzionano come i bead ma senza filtro all'interno. Queste particelle sferiche, vuote internamente, hanno un indice di rifrazione diverso rispetto a quello del guscio polimerico e agiscono come centro di scattering per gli UV. Il polimero da solo non assorbe le radiazioni UV, ma le sfere agiscono come centri di dispersione, aumentando la probabilità che i raggi incidenti incontrino i filtri presenti nella formulazione. Tra questi si ricorda il polimero acrilico Styrene/Acrylates Copolymer che agisce incrementando il fattore di protezione grazie ad un'azione di scattering.
- *Quencher*: sostanze non filtranti che abbattano i diversi stati eccitati dei filtri solari indispensabili per stabilizzare nel tempo il sistema filtrante. Possono essere opportunamente formulati per amplificare l'SPF e l'assorbimento dei raggi UVA.

1.11. Sun Protection Factor (SPF)

La “Raccomandazione della commissione europea sull’efficacia dei prodotti per la protezione solare e sulle sue relative indicazioni”, pubblicata nel 2006 (Racc. 22 settembre 2006, n. 2006/647/CE) dà indicazione sui metodi internazionali impiegabili per testare la protezione solare da UVA e UVB, ed inoltre sottolinea come siano da preferire i metodi di prova *in vitro* rispetto agli equivalenti *in vivo*, per preoccupazioni dal punto di vista etico delle sperimentazioni.

Al fine di garantire la riproducibilità e la comparabilità dei dati ottenuti, è opportuno attenersi ai protocolli internazionali. È possibile individuare diversi metodi per test SPF e per test UVA, che differiscono fra loro anche per l’approccio sperimentale, *in vivo* o *in vitro*.

SPF *in vitro*

Il test SPF *in vitro* è un metodo poco costoso, in grado di dare risultati con maggior rapidità e più etico del rispettivo test *in vivo*. Trovare la giusta procedura per avere dei risultati affidabili è una sfida ad oggi ancora aperta. Molti parametri influenzano le misurazioni: le limitazioni tecnologiche dei dispositivi, le caratteristiche chimico-fisiche dei supporti sostitutivi la cute, la difficoltà di applicare uno strato molto sottile di filtro solare sul supporto in maniera riproducibile tra i diversi laboratori, la complicata interpretazione dei fenomeni di scattering ed altre variabili non sempre note^{10,11}.

Prima del metodo di Diffey-Robson si sono susseguiti numerosi studi per trovare la procedura più adeguata. Le tecniche spesso davano risultati poco correlabili ai rispettivi saggi *in vivo*. La sfida più importante forse fu trovare un supporto che mimasse il più possibile il comportamento della cute, i substrati naturali per i test *in vitro* si rivelarono costosi, spesso di difficile manipolazione e la loro disponibilità limitata. Diffey e Robson nel 1989 si adoperarono per semplificare il problema introducendo il nastro Transpore[®]. Questo supporto dalla superficie irregolare permette di distribuire i campioni in maniera simile a quella che è la topografia dello strato corneo umano, inoltre si presenta come una matrice sufficientemente trasparente da poter trasmettere le radiazioni ultraviolette in uno spettro continuo fra i 290nm e i 400nm³.

Oggi il supporto suggerito dalla normativa ISO 24443:2012 è la piastra di polimetilmetacilato (PMMA). Le sue dimensioni non devono essere inferiori ai 16 cm².

(International standard ISO 24443:2012, Determination of Sunscreen UVA protection *in vitro*).

Diffey e Robson introdussero una formula per stimare il valore di SPF a partire dalle misurazioni effettuate:

$$SPF = \frac{\sum_{290}^{400} E(\lambda)\epsilon(\lambda)}{\sum_{290}^{400} E(\lambda)\epsilon(\lambda)T(\lambda)} \quad (1.3)$$

Dove $E(\lambda)$ è l'irradiazione spettrale della luce solare misurata alle ore 12 in un giorno di mezza estate in Europa meridionale a 40° di latitudine; $\epsilon(\lambda)$ rappresenta lo spettro d'azione eritematosa della luce solare ricavato da Diffrey e Mc Kinlay confrontando oltre 12 spettri d'azione eritematosa misurati tra il 1929 e il 1985 e $T(\lambda)$ la trasmittanza.

Infatti, il metodo adottato da Diffey e Robson è basato sulla misura della trasmittanza spettrale di un prodotto, ovvero dal rapporto tra la radiazione trasmessa dal campione e la radiazione totale incidente. In altre parole, è la differenza fra l'intensità di luce che attraversa il campione e l'intensità di luce che ne emerge. 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 $T(\lambda)$:

$$T(\lambda) = \frac{S_s(\lambda)}{S_0(\lambda)} \quad (1.4)$$

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.

SPF *in vivo*

Il metodo internazionale per l'SPF test è un metodo che utilizza una lampada ad arco a xenon, ovvero una sorgente luminosa in grado di simulare la luce solare, la cui radiazione luminosa emessa è definita e nota. Questa fonte di luce raggiunge alcuni siti collocati sulla schiena fra la vita e la linea delle spalle dei tester: alcuni di questi siti sono esposti alla luce senza l'applicazione di un filtro solare, altri invece sono esposti solo dopo aver applicato una formulazione protettiva. Al fine di determinare il valore di SPF, i soggetti vengono esposti ad una dose incrementale di raggi UV, questo porta i soggetti a mostrare eritema cutaneo a varie gradazioni, dal rossore alla vasodilatazione superficiale. Le risposte eritemiche vengono valutate visivamente dalle 16 alle 24 ore dopo l'esposizione ai raggi UV e giudicate da un valutatore esperto.

A seguire si distinguono la minima dose eritemica per la cute non protetta (MEDu) e la minima dose eritemica per la pelle protetta (MEDp) per ciascun tester. L' SPF viene a questo punto calcolato per ogni soggetto esposto attraverso il rapporto MEDp/MEDu. Il valore finale di SPF è la media dei valori individuali ottenuti. Il test richiede almeno 10 risultati validi ed un massimo di 20.

I soggetti validi per questo tipo di test vengono scelti accuratamente e devono rispondere a dei requisiti importanti: il loro fototipo deve appartenere alle categorie I, II, III della scala di Fitzpatrick (o devono avere un valore ITA°-Individual Typology Angle-> 28°)¹². I soggetti quindi sono persone la cui pelle va da molto chiara a chiara, quindi più sensibile alle radiazioni UV, il fototipo I ha un colorito bianco o molto pallido la cui pelle non si abbronzia ma tende a scottarsi, il fototipo II è pallido ma con una colorazione tendente al beige, il fototipo III è di solito beige o marrone chiaro, può scottarsi ma si abbronzia. Il soggetto che si espone al test non deve mai essere messo a rischio, quindi primariamente viene verificato che non abbia condizioni cutanee avverse e che quindi il test non comprometta il suo stato di salute oltre che sfalsare i risultati del saggio.

UVA in vitro

I protocolli COLIPA 2011 e FDA Final Rule 2011 sono i saggi impiegati per la valutazione della protezione ai raggi UVA. I parametri impiegati nei test sono allineati così da consentire la conformità ad uno e all'altro test. Il metodo *in vitro* non richiede risorse umane, e in questo caso si rivela facilmente riproducibile da diversi laboratori. Le misure forniscono le basi per un claim uniforme, l'obiettivo è quello di avere a disposizione solari che proteggano un ampio spettro di lunghezze d'onda.

L'UVA protection factor (UVA-PF) dovrebbe raggiungere almeno 1/3 del valore di SPF. Sia per le direttive statunitensi sia per le direttive europee il substrato da impiegare è il PMMA, ovvero una piastra di polimetilmetacrilato. La strumentazione richiesta da COLIPA 2011 è uno spettrofotometro ottico settato su un range di lunghezze d'onda fra i 290 e i 400nm con un'accuratezza entro un nanometro¹³.

I termini indicati da COLIPA utili a definire la protezione UVA sono:

- UVA-PF ovvero UVA protection factor. È il rapporto fra la dose minima necessaria ad indurre una pigmentazione persistente sulla pelle protetta da un prodotto solare, e la dose minima UVA necessaria ad indurre una minima pigmentazione persistente sulla stessa pelle non protetta.

- UVA-PF (0). Fattore di protezione UVA *in vitro* prima del saggio, quindi prima dell'esposizione ai raggi UV.
- Valore di lunghezza d'onda critica (λ_c). È definita come la lunghezza d'onda per cui la sezione sotto la curva di densità ottica è pari al 90% della sezione integrata fra i 290 e 400nm.

UVA *in vivo*

La Raccomandazione della Commissione CE del 2006 indica il metodo PPD (Persistent Pigment Darkening) per la valutazione della protezione dai raggi UVA come metodo *in vivo*. Va ricordato che è sempre preferito il metodo *in vitro* in quanto meno invasivo. Si tratta di un metodo analogo a quello usato per i raggi UVB ma il parametro utilizzato non è l'eritema, bensì il fenomeno della pigmentazione a due ore dall'esposizione, da cui si ricava l'indice di protezione UVA:

$$UVA PF = \frac{\text{minima dose pigmentogena su pelle protetta (MPDp)}}{\text{minima dose pigmentogena su pelle non protetta (MPDu)}}$$

I soggetti validi per questo tipo di test appartengono al II, III, e IV fototipo. Vengono esposti a sorgente di luce proveniente da lampada a Xenon filtrata. L'osservazione può avvenire da 2 ore fino a 24 ore dopo l'esposizione.

1.12. Oxisol®

Si tratta di una molecola antiossidante di natura benzimidazolica ancora oggi oggetto di studio e frutto di una collaborazione Università-Impresa tra Ambriosialab srl, il Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie dell'Università degli Studi di Ferrara e l'azienda Kalichem.

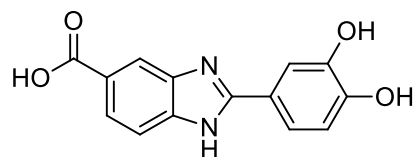


Figura 17. Dihydroxyphenyl benzimidazole carboxylic acid (Oxisol®).

Può essere considerato un nuovo SPF Booster con capacità di scavenger contro i radicali liberi, e ciò fa di esso una molecola unica nel suo genere, come descritto in **Figura 18**.

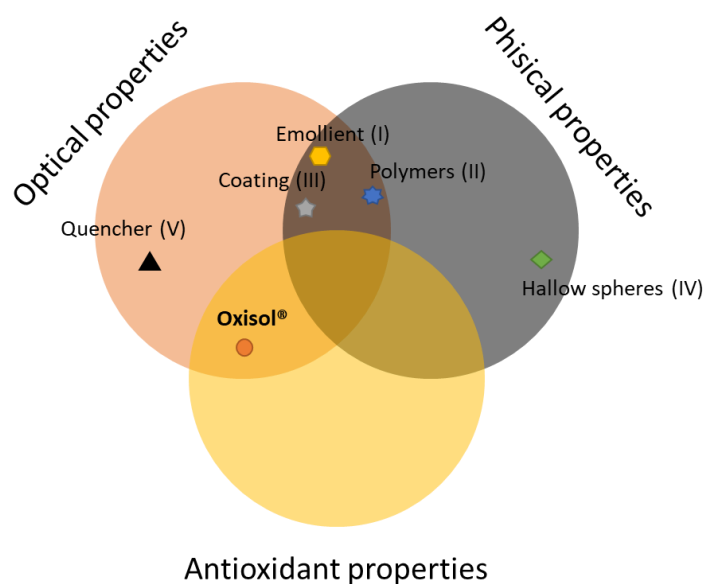


Figura 18. Descrizione del collocamento di Oxisol® rispetto agli altri Booster. Questa è l'unica molecola a possedere attività antiossidante.

Il potere antiossidante è espresso come confronto con i valori misurati per quantità note di una molecola antiossidante scelta come standard di riferimento, che di solito è Trolox. Per misurare il potere antiossidante di Oxisol sono stati effettuati i seguenti test: DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile), FRAP (ferric reducing antioxidant power), PCL (photochemiluminescence). Come si può osservare nella Tabella sottostante, in termini di TEAC, la capacità antiossidante di Oxisol® è di gran lunga superiore a molte note molecole antiossidanti.

	Emulsion Base 1.5% Vit C	Emulsion Base 1.5% Vit. E	Emulsion Base Cosmetic Europe 1% Oxisol	Emulsion Solar benchmark (Bionike) 50+	Emulsion antiox (Venus) 1% Vit C	Emulsion C Benchmark (Reti-C)	Emulsion Base solar milk Oxisol 3%
PCL-ACL micromol TE/g	79.1±5	47.37±5	154.6±7	4.2±5	2.19±5	211.13±7	433.49±6.6

Tabella 7. Capacità antiossidante di Oxisol per comparazione con altri antiossidanti noti.

Come si può osservare, una concentrazione all'1% di Oxisol® risulta essere più potente dei più comuni agenti antiossidanti (vitamina C e vitamina E) anche all'interno di formulazioni commerciali. All'interno di una formulazione solare, utilizzando il 3% di questa sostanza, il poter antiossidante aumenta notevolmente (tre volte superiore). Tale capacità può essere ulteriormente argomentata analizzando i valori delle materie prime riportati nella tabella sottostante (**Tabella 8**).

	Oxisol®	Copherol C	Alpha-tocopherol	Resveratrol	BHT	Ascorbic acid
PCL-ACL μmol TE/g	48750±5	4583±5	2770±7	1370±5	4575±5	16000±7
DPPH μmol TE/g	4225±5				3249±5	
FRAP μmol TE/g	9004±5				4168±5	

Tabella 8. Confronto tra Oxisol® ed i più comuni agenti antiossidanti.

In seguito ad una lunga esposizione ai raggi UV le comuni reazioni che si innescano comprendono fototossicità, perossidazione lipidica, foto-danneggiamento di proteine, rottura del DNA. Sono stati effettuati test di confronto tra Oxisol® e PBSA: come si può notare dai grafici sottostanti, Oxisol® ha registrato risultati migliori rispetto al PBSA (**Figura 19** e **Figura 20**).

Per valutare la fototossicità è stata usata la stessa linea cellulare per le diverse molecole oggetto di studio. Le cellule sono state trattate con una soluzione 50mM del composto e dopo

30 minuti sono state irradiate con raggi UVA o UVB (20 J/ cm) con due importi di energia diversi: 0.5 J/cm e 1 J/cm UVB¹⁴.

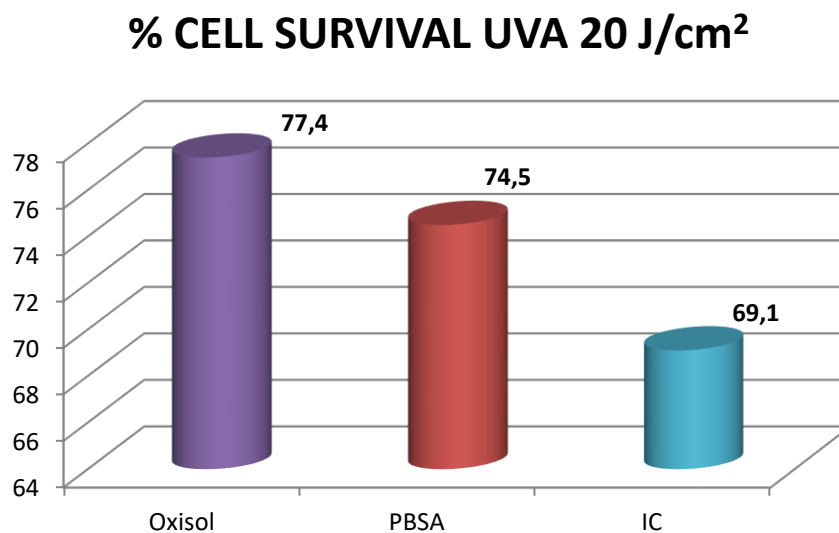


Figura 19. Cellule sopravvissute in seguito a radiazione UVA. Confronto tra Oxisol[®], PBSA ed IC (controllo irritato).

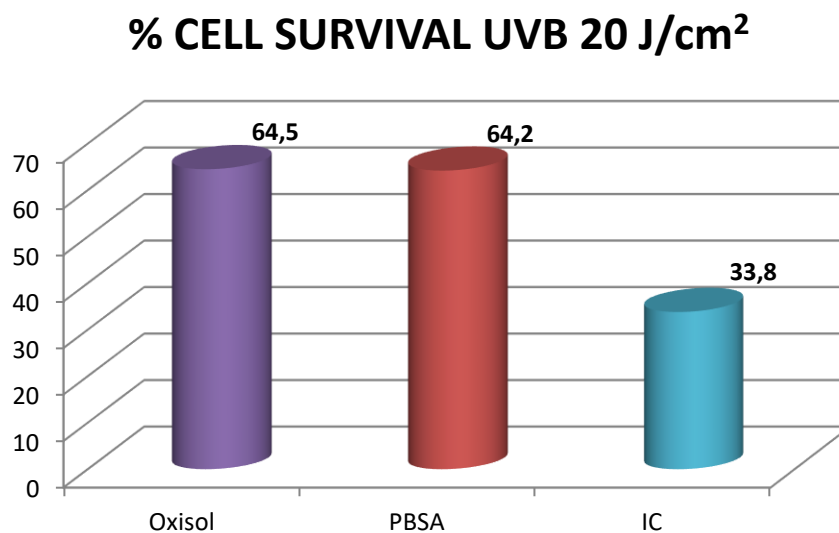


Figura 20. Cellule sopravvissute in seguito a radiazione UVB. Confronto tra Oxisol[®], PBSA ed IC (controllo irritato).

Quando le cellule sono state irradiate in presenza di Oxisol[®] è stata registrata una significativa riduzione della perossidazione lipidica rilevata dopo una dose superiore di raggi UVB (**Figura 21**).

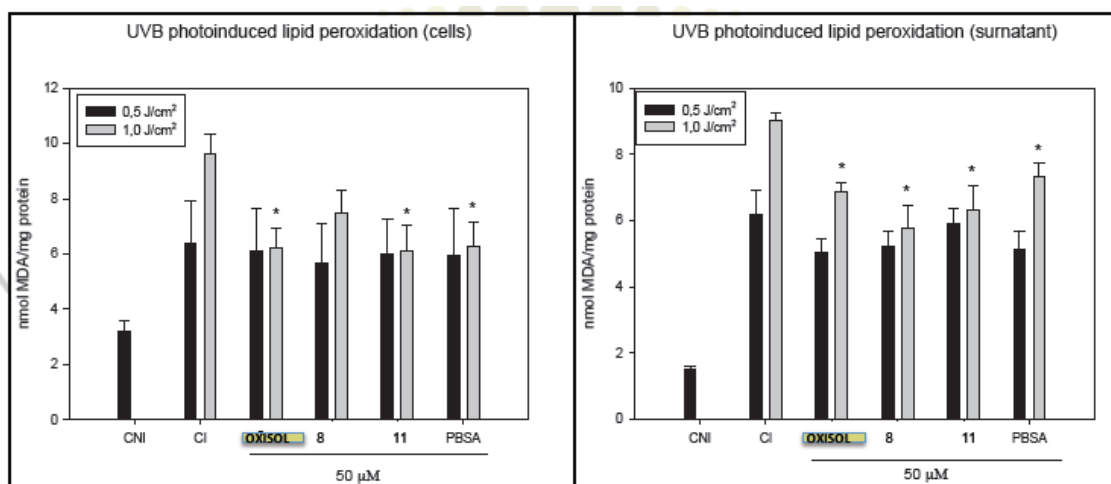


Figura 21. Confronto della perossidazione lipidica fotoindotta.

Nel grafico sottostante (Figura 22) possiamo notare come i campioni irradiati in presenza di PBSA hanno mostrato un chiaro aumento di rottura del filamento di DNA rispetto al controllo non irradiato, ma anche al controllo irradiato. Per quanto riguarda Oxisol®, si può notare un importante decremento del valore misurato rispetto al controllo irradiato.

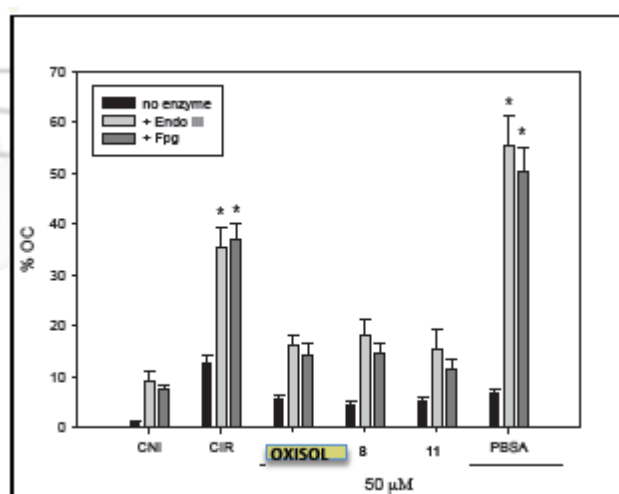


Figura 22. Confronto della rottura del filamento di DNA in seguito a radiazione.

Oltre ad essere un innovativo ingrediente antiossidante, Oxisol® è anche in grado di aumentare il fattore di protezione SPF e UV-A. Gli studi di tossicità finora condotti indicano un alto profilo di sicurezza, e Oxisol® permette di avere una protezione ad ampio spettro senza rischi di fotoinstabilità.

In conclusione, si può affermare che, per la prima volta, è stata applicata una molecola polifunzionale che da sola è in grado di funzionare come SPF Booster e scavenger di radicali liberi.

Va precisato che generalmente i Booster vengono aggiunti direttamente alla fase acquosa prima di effettuare l'agitazione con il turbo emulsore e formare così l'emulsione.

Oxisol[®] rappresenta invece un caso particolare: per solubilizzarsi infatti necessita di riscaldamento e di un pH basico.

È stata dimostrata inoltre la validità della presenza di Oxisol[®] in formulazioni solari con filtri fisici.

Sono state preparate formulazioni contenenti solamente il filtro fisico e formulazioni contenenti il filtro fisico e Oxisol[®]. Tra i campioni analizzati i risultati più interessanti, in termini di SPF ed UVAPF, sono stati ottenuti con una concentrazione di Oxisol[®] al 3%. A tale concentrazione si è notato un notevole incremento del Fattore di Protezione Solare (SPF) in tutte le formulazioni (**Tabella 9** e **Figura 23**)

Oxisol [®] (%)	Diffey-Robson	SPF ISO 24443:2012
0.5	41.86	42.91
1.0	52.46	46.75
1.5	57	48.58
2.0	63.53	53.14
3.0	70.33	60.23
5.0	73.06	62.04

Tabella 9. Valori di SPF riferiti alle due metodiche utilizzate nello studio.

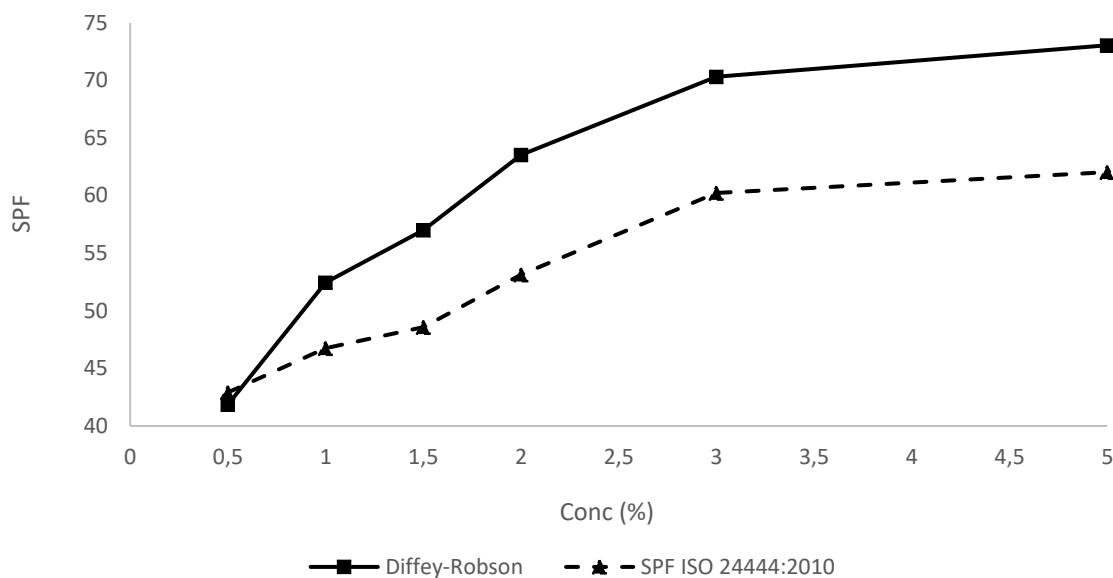


Figura 23. Andamento dell'SPF in relazione all'aumento di Oxisol®.

Inoltre, è stato valutato l'effetto booster di Oxisol® in dipendenza della sua concentrazione: dai risultati ottenuti è stato notato che il valore SPF cresce in maniera proporzionale a mano a mano che le concentrazioni di Oxisol® sono aumentate, tuttavia con una concentrazione superiore al 3% si raggiunge una condizione di plateau. L'aumento dell'SPF in questo caso non viene considerato rilevante. Inoltre, l'Oxisol® confrontato con altri booster già in commercio dimostra avere un effetto maggiore rispetto a quello delle altre molecole (sempre ad una concentrazione del 3%)¹⁴.

1.13. Acido Ferulico

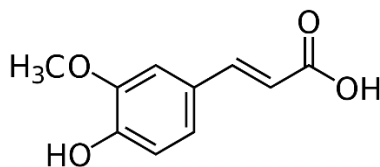


Figura 24. Struttura dell'acido ferulico.

Si tratta di un acido idrossicinnamico abbondante nella parete cellulare delle piante legate covalentemente come catene laterali a molecole come gli arabinossilani.

L'acido ferulico (**Figura 24**) è presente in numerose specie vegetali, ne sono tuttavia particolarmente ricchi i germogli di bambù e i cereali. Assieme agli acidi caffeico ed isoferulico rappresenta un importante metabolita degli acidi clorogenici e viene assorbito

nell'intestino tenue. Altri metaboliti come acido diidroferulico, feruloilglicina e acido diidroferulico solfato sono prodotti dall'acido clorogenico nell'intestino crasso dall'azione della flora intestinale.

Tra i cereali l'acido ferulico è particolarmente abbondante nella crusca. Nello strato duro del grano, infatti, i composti antiossidanti sono per la maggior parte presenti come acido ferulico. Questi, tuttavia, è insolubile a causa di legami con altre molecole che ne aumentano la lipofilia. In queste piante l'acido ferulico contribuisce attivamente alla prevenzione di malattie fungine ¹⁵.

Le piante di eudicotteri asteridi possono anche produrre acido ferulico. Il tè preparato dalle foglie di yacón (*Smallanthus sonchifolius*), una pianta tradizionalmente coltivata nelle Ande settentrionali e centrali, contiene quantità tangibili di acido ferulico. Nei legumi, la varietà di fagioli bianchi è la fonte più ricca di acido ferulico tra le varietà di fagioli comuni (*Phaseolus vulgaris*). Si trova anche nel fagiolo di Madras (*Macrotyloma uniflorum*).

Sebbene ci siano molte fonti di acido ferulico in natura, la sua biodisponibilità dipende dalla forma in cui è presente: l'acido ferulico libero, infatti, ha una solubilità limitata in acqua e quindi una scarsa biodisponibilità. In particolare, nel chicco di grano, l'acido ferulico si trova legato ai polisaccaridi della parete cellulare, consentendone il rilascio e l'assorbimento nell'intestino tenue¹⁶.

Come molti fenoli naturali, l'acido ferulico è un antiossidante, reattivo verso i radicali liberi come le specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS sono radicali liberi notoriamente implicati nel danno al DNA, nel cancro e nell'invecchiamento accelerato delle cellule.

Se aggiunto ad una preparazione topica di acido ascorbico e vitamina E, l'acido ferulico può ridurre lo stress ossidativo e la formazione di dimeri di timina nella pelle. Ricerche ancora in fase embrionale dimostrano che integratori orali di acido ferulico possono inibire la produzione di melanina nel processo di sbiancamento della pelle¹⁷.

1.14. Acido Ellagico

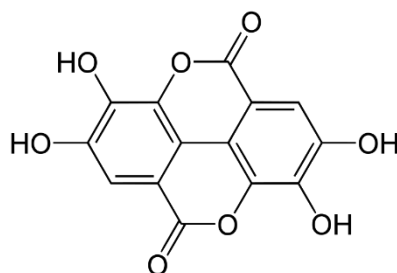


Figura 25. Formula di struttura dell'acido ellagico.

L'acido ellagico è un antiossidante fenolico naturale presente in numerosi frutti e verdure. Le proprietà inibitorie della crescita cellulare ed antiossidanti dell'acido ellagico hanno spinto la ricerca sui suoi potenziali benefici per la salute. L'acido ellagico è il dilattone dell'acido esaidrossidifenilico.

L'acido ellagico è presente in piante quali la quercia bianca nordamericana (*Quercus alba*) e la quercia rossa europea (*Quercus robur*). Anche il macrofite *Myriophyllum spicatum* produce acido ellagico oltre al fungo *Phellinus linteus*.

Come accennato, l'acido ellagico ha proprietà inibitorie della crescita cellulare ed antiossidanti dimostrate in differenti studi¹⁸. Le proprietà inibitorie dell'acido ellagico possono essere ricercate nella sua capacità di inibire direttamente il legame del DNA di alcuni agenti cancerogeni, tra cui nitrosammine¹⁹ e idrocarburi policiclici aromatici²⁰. Come con altri antiossidanti polifenolici, l'acido ellagico ha un effetto chemoprotettivo nei modelli cellulari riducendo lo stress ossidativo.

1.15. Avobenzone

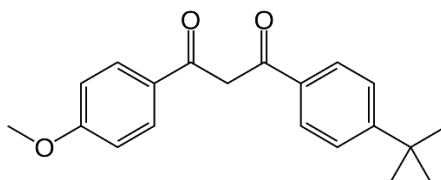


Figura 26. Formula di struttura dell'Avobenzone.

Il suo nome INCI è Butyl Methoxydibenzoylmethane, mentre la nomenclatura IUPAC lo descrive come 1-(4-Methoxyphenyl) -3-(4-tert-butylphenyl) propano-1,3-dione. È un filtro

liposolubile impiegato comunemente in ambito cosmetico ai fini della protezione solare. È stato brevettato nel 1973 ed approvato in EU nel 1978. La FDA lo ha approvato solo nel 1988.

L'Avobenzone si presenta come una polvere cristallina giallo paglierino particolarmente solubile in isopropano, decil propano e trigliceridi dell'acido caprico e caprilico. È un derivato del dibenzoilmetano ed esiste allo stato fondamentale come una miscela delle forme cheto-enoliche, dove la forma enolica è favorita. Questa forma enolica, oltretutto, è stabilizzata da un legame idrogeno intramolecolare all'interno del β -dichetone.

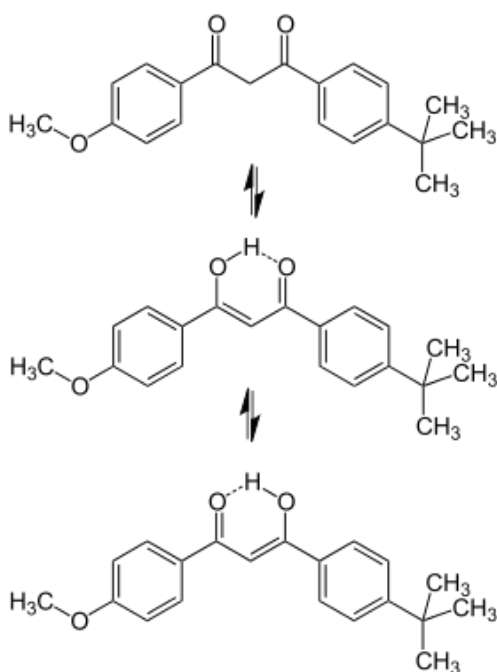


Figura 27. Tautomeria cheto-enolica dell'Avobenzone. La forma enolica è stabilizzata da legami idrogeno intramolecolari.

La sua capacità di assorbire la luce ultravioletta su una gamma più ampia di lunghezze d'onda rispetto a molti altri filtri solari ha portato al suo uso in molti prodotti per il suncare commercializzati come filtri solari ad ampio spettro. L'avobenzone ha un assorbimento massimo a 357 nm²¹.

L'avobenzone è sensibile alle proprietà del solvente, essendo relativamente stabile in solventi protici polari ed instabile in ambienti non polari. In seguito a radiazione solare, in particolare UVA, passa ad uno stato eccitato di tripletto nella forma cheto che può portare a degradazione del filtro stesso²².

È stato dimostrato che l'avobenzone si degrada in modo significativo alla luce, con conseguente diminuzione della protezione nel tempo e la radiazione UVA in un giorno di luce solare in un clima temperato è sufficiente per abbattere la maggior parte del composto.

I dati presentati alla Food and Drug Administration dalla Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association indicano un calo del 36% dell'assorbanza UV di avobenzone dopo un'ora di esposizione alla luce solare²³.

L'avobenzone mostra tautomerismo cheto-enolico con tre possibili tautomeri: due tautomeri enolici (E1 ed E2) ed uno chetonico (K) (**Figura 28**).

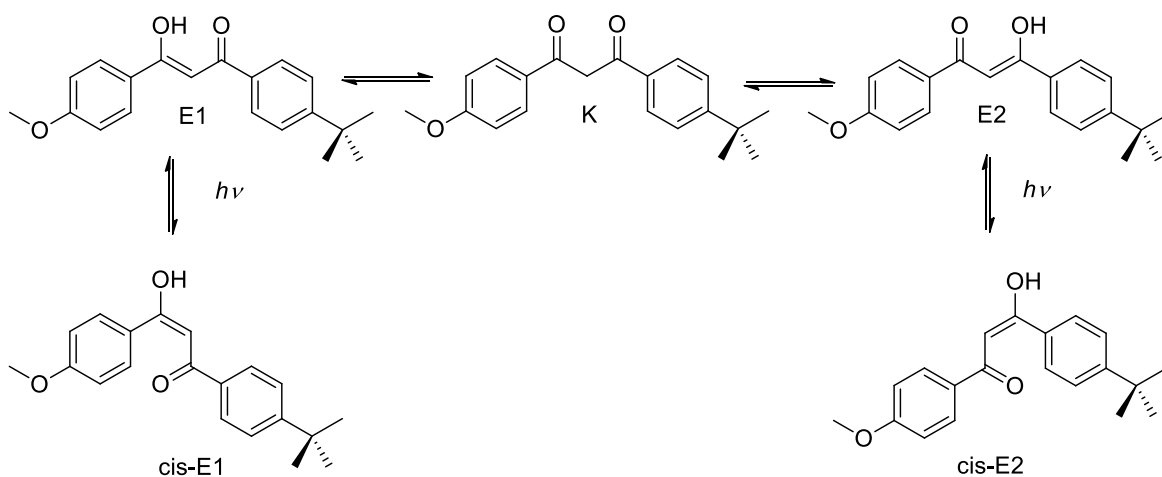


Figura 28. Tautomerismo cheto enolico e fotoisomerizzazione della molecola di Avobenzone.

Le forme enoliche sono stabili in soluzioni ed emulsioni e sono responsabili dell'assorbimento della luce UV tra 349,9 e 363 nm (regione UVA), mentre il chetone è stabile solo dopo la fotoisomerizzazione ed assorbe nella regione UVC²⁴.

L'uso diffuso di questa molecola nelle formulazioni di prodotti solari ha motivato numerosi studi sulle sue proprietà fotofisiche.

La degradazione dell'avobenzone può essere ridotta usando un fotostabilizzatore, come l'octocrylene. La complessazione con ciclodestrine è un'altra tecnica impiegata per migliorare la fotostabilità del filtro.

2. Fotocatalisi

Per fotocatalisi si intende quel fenomeno per il quale una sostanza, nello specifico il fotocatalizzatore, modifica la velocità di una reazione chimica attraverso l'azione della luce.

Questa proprietà, ascrivibile ad alcuni materiali, fu scoperta da Fujishima e Honda nel 1972, i quali, nel tentativo di imitare la fotosintesi, si erano proposti di scindere l'acqua tramite azione della luce (fotoelettrolisi). A tal fine hanno costruito un circuito elettrico nel quale gli elettrodi immersi in acqua erano costituiti da TiO_2 e Pt (contro-elettrodo). L'illuminazione dell'elettrodo di TiO_2 con luce di lunghezza d'onda inferiore a 415 nm ha portato al flusso di una corrente dal contro-elettrodo in platino all'elettrodo di TiO_2 attraverso il circuito esterno. Dalla direzione del flusso di corrente hanno dedotto che la reazione di ossidazione avvenisse all'elettrodo di TiO_2 , mentre quella di riduzione nel contro elettrodo di platino. L'acqua è stata quindi scissa senza l'applicazione di un voltaggio esterno.



Reazione generale:



Il meccanismo di fotocatalisi è del tutto simile e conduce alla formazione di reagenti fortemente ossidati in grado di decomporre le sostanze organiche e inorganiche presenti. Le sostanze in grado di comportarsi come fotocatalizzatori in seguito ad irraggiamento della luce sono i semiconduttori.

Un semiconduttore è un materiale con una struttura a bande caratterizzata da una banda di valenza (VB) quasi piena ed una di conduzione (CB) quasi vuota. La differenza di energia fra la banda di valenza e la banda di conduzione è detta intervallo di energia proibita (E_g) ed il suo valore è considerato essere, approssimativamente, inferiore od uguale a 4 eV. Proprio il fatto che l'intervallo di energia proibita nei semiconduttori sia abbastanza piccolo permette il verificarsi dell'eccitazione di un gran numero di elettroni dalla banda di valenza a quella di conduzione. La differenza fra un isolante ed un semiconduttore è proprio nel valore dell'intervallo di energia proibita, che nell'isolante è compreso tra 4 e 10 eV. Un

semiconduttore presenta, quindi, conducibilità intermedia fra un isolante ed un conduttore (**Figura 29**).

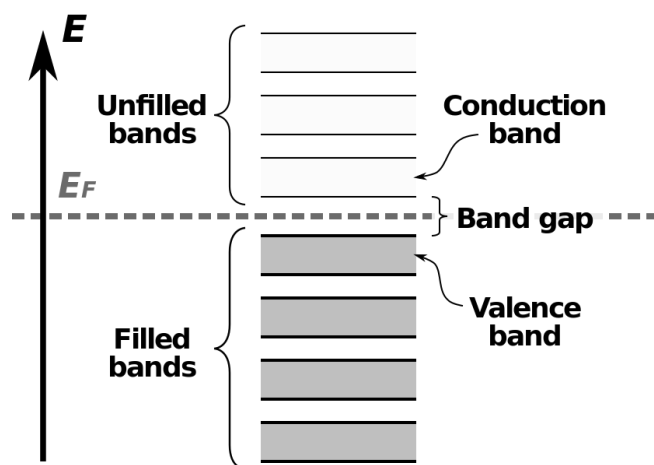


Figura 29. Struttura a bande di un semiconduttore.

Quando una luce di opportuna lunghezza d'onda ($h\nu > E_g$) incide sul semiconduttore, un elettrone (e^-) sarà in grado di migrare dalla banda di valenza a quella di conduzione, generando una vacanza elettronica o lacuna (h^+), al limite superiore della banda di valenza. Le specie e^- ed h^+ sono in grado, rispettivamente, di ridurre ed ossidare una sostanza adsorbita sulla superficie del fotocatalizzatore. Se è coinvolta acqua nel processo le lacune (h^+) possono produrre radicali ossidrilici (OH^\bullet), mentre gli elettroni (e^-) sono abbastanza riducenti da produrre dall'ossigeno l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$). Queste due specie, fortemente reattive, sono in grado di decomporre le sostanze adsorbite (**Figura 30**).

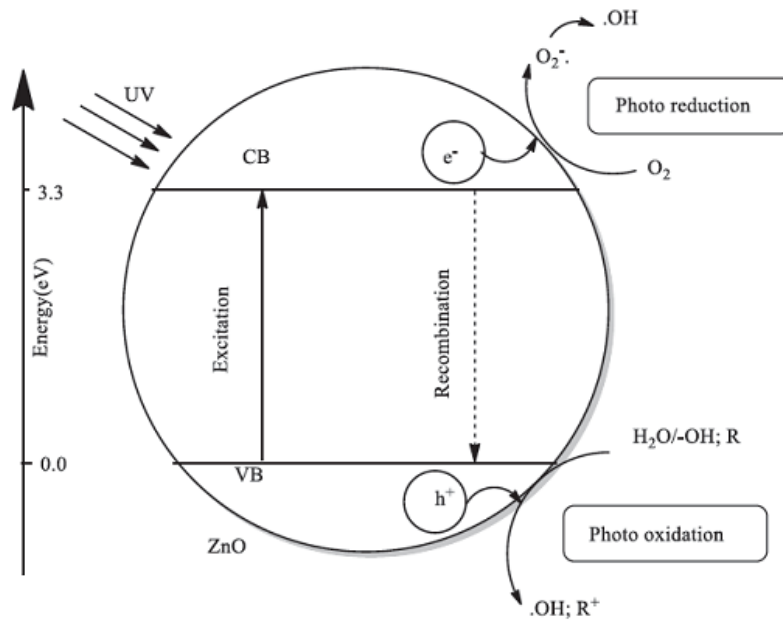
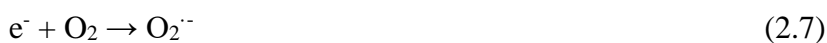
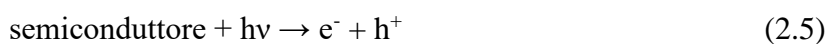


Figura 30. Meccanismo di reazione fotocatalizzata da ZnO. Il principio è estendibile anche a TiO₂ ed altri materiali fotocatalitici.

Diversi sono i semiconduttori utilizzati come fotocatalizzatori: TiO₂, ZnO, CdS e α-Fe₂O₃. Fra questi, l'ematite mostra attività fotocatalitica inferiore rispetto a quella del TiO₂, nonostante assorba nella regione del visibile; il CdS e lo ZnO, oltre ad essere meno fotoattivi del TiO₂, presentano lo svantaggio di rilasciare in soluzione, rispettivamente, ioni Cd²⁺ e Zn²⁺. Il TiO₂ dimostra di essere il migliore fotocatalizzatore, sia in termini di costi che di attività.

Le reazioni che avvengono in un semiconduttore sono delle più svariate, di seguito si riassumono le più interessanti:



La reazione 2.5 è relativa alla formazione della coppia fotogenerata elettrone-lacuna nel semiconduttore in seguito ad irradiazione con luce solare. La reazione 2.6, invece, alla ricombinazione delle coppie elettrone-lacuna sulla superficie delle particelle. Perché l'effetto fotocatalitico sia efficace, è necessario che la reazione 2.6 si sviluppi il meno

possibile in modo che le reazioni 2.7-2.10 siano favorite. Solo queste reazioni, infatti, conducono all'attacco del substrato organico con conseguente sviluppo della reazione fotocatalizzata. Dopo il fluoro, i radicali ossidrilici sono i più forti ossidanti esistenti in natura e l'entità dell'effetto dipende dall'energia dei fotoni incidenti, non dalla loro intensità: ciò significa che anche pochi fotoni aventi la necessaria energia, sono in grado di stimolare l'attività fotocatalitica. La reazione fotocatalitica si sviluppa sulla superficie del semiconduttore, dove le particelle organiche vengono adsorbite, e segue la cinetica di Langmuir-Hinshelwood, dove la velocità di reazione R è proporzionale all'entità del ricoprimento della specie adsorbita, θ , secondo la seguente equazione:

$$R = -\frac{dc}{dt} = k_r \theta = \frac{k_r KC}{1+KC} \quad (2.11)$$

dove k_r è la costante di reazione, K il coefficiente di adsorbimento del reagente e C la concentrazione del reagente. Quando la concentrazione di sostanza organica (reagente) è bassa, il termine KC è trascurabile e l'equazione (2.11) può essere approssimata ad una reazione di pseudo-primo ordine. Integrando ed assumendo che quando la radiazione raggiunge il fotocatalizzatore ($t = 0$), si ha $C = C_0$, allora si ottiene:

$$\ln\left(\frac{C_0}{C}\right) = k't \quad (2.12)$$

dove C_0 è la concentrazione iniziale di sostanza organica, k' la costante di velocità apparente per reazioni di pseudo-primo ordine.

L'efficacia di un fotocatalizzatore dipende da numerosi parametri. Tra i più importanti vanno sicuramente annoverati la tipologia e la quantità relativa di fase cristallina presente, la dimensione delle particelle, la loro area superficiale, la tipologia dei materiali da degradare, il grado di cristallinità, le impurezze, la densità dei gruppi ossidrilici di superficie ed il metodo di preparazione. Catalizzatori di dimensione nanometrica sono preferibili in quanto, a dimensioni $<10\text{nm}$, la variabile dell'area superficiale può diventare determinante. Dal momento che l'attività fotocatalitica si esplica sulla superficie del fotocatalizzatore, l'elevato rapporto superficie/volume che caratterizza un nanomateriale contribuisce ad incrementare la velocità delle reazioni di fotodecomposizione aumentando la disponibilità di siti superficiali. Inoltre, variando la dimensione dei cristalli, è possibile variare il potenziale redox della coppia fotogenerata (e^-h^+). Infatti, nei nanocristalli, si ha l'allargamento dell'intervallo di energia proibita, i potenziali redox aumentano, anche se la presenza di difetti nel reticolo cristallino può dare origine a fenomeni di ricombinazione di carica che

limitano l'attività fotocatalitica. Morfologie quali nanotubi, nano-rods o nano-flowers possono ulteriormente influenzare l'attività.

Un altro fenomeno associato alla fotocatalisi, in particolare al TiO_2 , è stato scoperto fortuitamente nei laboratori della TOTO Ltd., JP, nel 1997. Si tratta dell'idrofilia fotoindotta (PIH), la quale consta nel fatto che, dopo illuminazione UV, parte degli elettroni e delle lacune fotogenerate reagiscono in modo differente con gli elettroni che tendono a ridurre i cationi Ti^{4+} in Ti^{3+} e le lacune che ossidano gli anioni O^{2-} . Attraverso questo processo gli atomi di ossigeno sono espulsi e le vacanze formatesi sono riempite d'acqua. I gruppi ossidrilici che vengono così a formarsi rendono idrofila la superficie di TiO_2 . L'aumento del tempo di esposizione alla luce della superficie di TiO_2 riduce l'angolo di contatto con l'acqua. L'acqua, anziché raccogliersi in gocce, tende così a formare sulla superficie un film continuo. Questa caratteristica, come accennato, è peculiare del TiO_2 ²⁵.

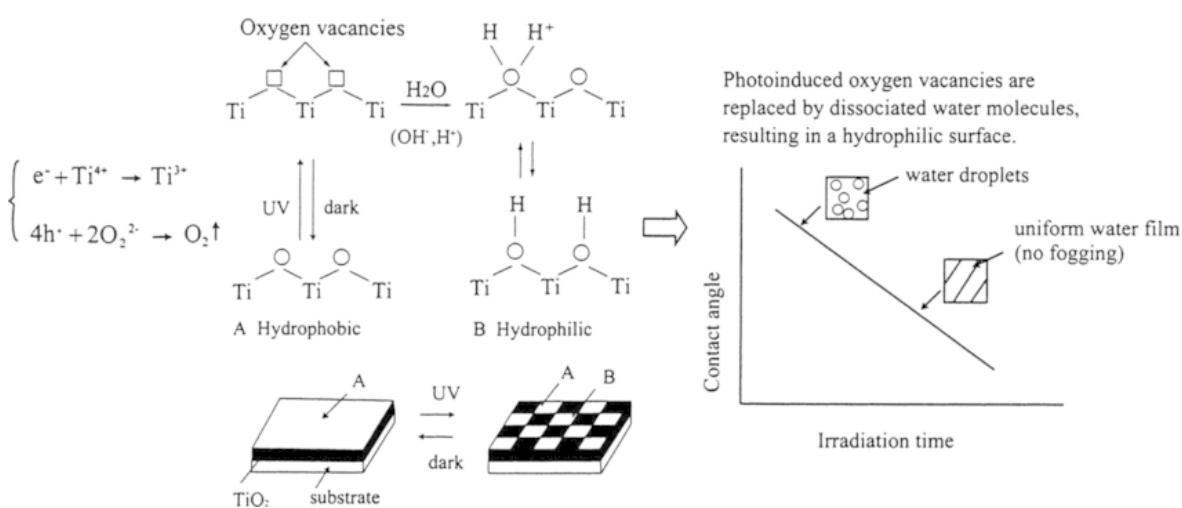


Figura 31. Meccanismo dell'idrofilia fotoindotta (PIH).

2.1. Ossido di Titanio (TiO₂)

Il titanio rappresenta uno dei più importanti metalli dal punto di vista industriale e commerciale. Grandi quantità di TiO₂ sono impiegate come pigmento e riempitivo, mentre il Ti metallico è importante per le sue caratteristiche di durezza, densità e resistenza alla corrosione. Il TiCl₃ è ugualmente importante per il suo ruolo di catalizzatore di Ziegler-Natta nella produzione di polietilene e di altri polimeri.

Distribuzione ed abbondanza

Il Ti è il non elemento per abbondanza in peso sulla crosta terrestre. I principali minerali che lo contengono sono l'ilmenite (FeTiO₃) ed il TiO₂ nella forma cristallina del rutilio. Nel 1992 la produzione mondiale è stata di 7.8 milioni di tonnellate di ilmenite e 471 000 tonnellate di rutilio. La produzione di Ti metallico è attorno alle 50 000 tonnellate annue. I maggiori produttori sono Canada (27%), Australia (24%) e Norvegia (9%).

Estrazione ed Usi

Il Ti ha la caratteristica di essere estremamente duro con un alto punto di fusione (1667°C) ed è più duro e molto più leggero dell'acciaio (4.4 g/cm³ contro i 7.87 g/cm³). Tuttavia, anche una minima traccia di impurezza di non metalli quali H, C, N od O rendono il Ti fragile. Il titanio possiede un'elevata resistenza alla corrosione, migliore dell'acciaio inossidabile, ed è un conduttore di calore ed elettricità. Il Ti metallico e le sue leghe con alluminio sono ampiamente usate nell'industria aeronautica per i motori jet a turbina e per le intelaiature degli aerei. Non solo nell'aeronautica ma anche in campo nautico e negli impianti chimici il titanio trova largo impiego: infatti la sua aggiunta in lega con l'acciaio contribuisce a renderlo maggiormente resistente.

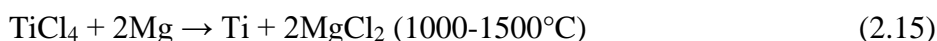
Il metallo è difficile da estrarre a causa del suo elevato punto di fusione e della sua estrema reattività all'aria, ossigeno, azoto ed idrogeno a temperature elevate. L'ossido può essere ridotto da C o CO formando carburi. Per riscaldamento in presenza di C e Cl₂ a 900°C, il TiO₂ da TiCl₄:



Il TiCl_4 liquido (punto di ebollizione 137°C) verrà separato dalle altre impurezze per distillazione e potrà essere impiegato in uno dei processi sotto descritti.

Processo Kroll

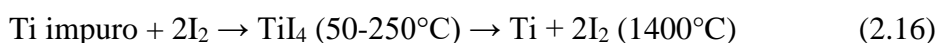
Wilhelm Kroll produsse il titanio riducendo il TiCl_4 con calcio in un forno elettrico. Più tardi vennero usati Mg ed anche Na. La reazione è condotta in atmosfera di Argon a causa dell'alta reattività del Ti ad elevate temperature.



Il processo prosegue lavando il MgCl_2 con acqua o con HCl diluito che scioglie l'eccesso di Mg. Un'alternativa è rappresentata dalla distillazione sottovuoto di MgCl_2 . In ogni caso ciò che rimarrà sarà una spugna di Ti e non un blocco compatto. La forma compatta sarà ottenuta mediante fusione all'arco elettrico sottovuoto in atmosfera controllata di Ar. La necessità di lavorare in atmosfera controllata unitamente al costo di Mg e Na rendono questo processo estremamente costoso.

Metodo van Arkel-de Boer

Piccole quantità di metallo molto puro sono ottenute attraverso questo procedimento. Il titanio impuro viene riscaldato con I_2 sottovuoto, dando origine a TiI_4 che volatilizza separandosi dalle impurezze. A pressione atmosferica il TiI_4 fonde a 150°C e bolle a 377°C , ma a pressioni minori tali valori si abbassano notevolmente. Il TiI_4 è quindi composto al calor bianco su un filamento di tungsteno:



Lo stato (+IV)

Ossidi

La produzione mondiale di TiO_2 è stata di 4.1 milioni di tonnellate nel 1992 e più della metà trova impiego come pigmento bianco nelle vernici e come opacizzante per vernici colorate. Ha sostituito interamente i primi pigmenti bianchi usati quali $(2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2)$, BaSO_4 e CaSO_4 , in particolare rispetto ai composti del piombo, il TiO_2 mostra vantaggi quali minore tossicità, maggior potere ricoprente e nessun annerimento se esposto a H_2S . Trova anche impiego come sbiancante della carta, come riempitivo per materie plastiche e gomme, opacizzante e sbiancante del nylon e nell'industria cosmetica.

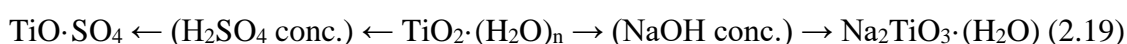
Esistono due processi per ottenere TiO₂ puro: l'ormai vecchio processo al solfato ed il più recente processo al cloruro. In quest'ultimo processo il rutilio (TiO₂) è riscaldato con coke e cloro a 900°C con formazione di TiCl₄ che è volatile e può quindi essere separato da impurezze. Il TiCl₄ è quindi riscaldato con O₂ a circa 1200°C per ottenere TiO₂ e Cl₂ che verrà riutilizzato.



Nel processo al solfato, invece, l'ilmenite FeTiO₃ è digerita con H₂SO₄ concentrato per dare Fe^{II}SO₄, Fe^{III}(SO₄)₃ e solfato di titanile TiO·SO₄. La massa è quindi lisciviata con acqua ed ogni materiale insolubile è rimosso. Fe^{III} in soluzione viene ridotto a Fe^{II} usando limatura di ferro, quindi FeSO₄ viene cristallizzato mediante evaporazione sottovuoto e raffreddamento. La soluzione di TiOSO₄ viene idrolizzata mediante ebollizione e la soluzione seminata con cristalli di rutilio ed anatasio.

Il TiO₂ si trova in tre forme cristalline: rutilio, anatasio e brookite. Il rutilio è la forma più comune nella quale ciascun atomo di Ti è circondato ottaedricamente da sei atomi di O. Le strutture degli altri due composti sono riarrangiamenti ottaedrici distorti. Gli ossidi sono insolubili in acqua e gli ioni M⁴⁺ non esistono in soluzione pur avendo formazione di MO²⁺ da sali basici quali TiOSO₄. Entrambi gli ioni TiO²⁺ o [Ti(OH)₂]²⁺ sono presenti in soluzione ma allo stato solido polimerizzano per dare catena (TiO)²⁺_n con ossigeni a ponte.

Il TiO₂ è anfotero e si scioglie sia nelle basi che negli acidi formando titanili e composti di titanile.



Alogenuri

Il TiCl₄ è il più noto alogenuro ed è ottenuto facendo passare Cl₂ sopra TiO₂ e C riscaldati. È un liquido fumante, covalente, incolore e diamagnetico.

Soluzioni di AlEt₃ e TiCl₄ in solvente idrocarburico reagiscono per dare un solido marrone, cioè il catalizzatore di Ziegler-Natta, producendo polimeri stereoregolari con proprietà di maggiore resistenza rispetto a polimeri atattici o disordinati. Nella reazione di

polimerizzazione la specie attiva è Ti^{III} e $AlEt_3$ può ridurre $TiCl_4$ a $TiCl_3$ in situ. Un atomo di Cl è sostituito da un etile, il doppio legame dell'etilene si coordina quindi ad un sito vacante del catalizzatore ed avviene una reazione di spostamento del carbonio e l'etene migra e si inserisce tra Ti e C nel legame Ti-Et generando la crescita della catena.

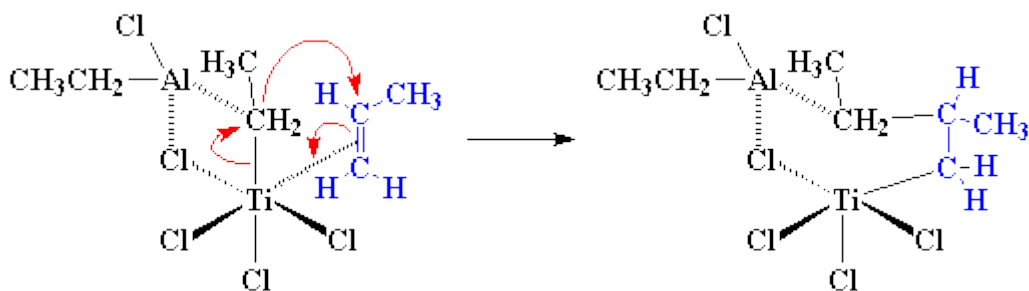


Figura 32. Schema di polimerizzazione con un catalizzatore di Ziegler-Natta.

2.2. Ossido di Zinco (ZnO)

Lo zinco, come tutti gli elementi del Gruppo 12, hanno configurazione $d^{10}s^2$ e formano normalmente ioni M^{2+} . Lo zinco è prodotto in larga scala e gli ultimi dati disponibili parlano di una produzione di 7.3 milioni di tonnellate. Trova impiego come metallo di protezione antiruggine, per ricoperture e per ottenere leghe. È presente in differenti enzimi e biologicamente è al secondo posto per importanza tra gli elementi di transizione.

Distribuzione ed abbondanza

Lo Zn si trova sulla crosta terrestre in quantità pari a 132 ppm in peso ed è il ventiquattresimo elemento per abbondanza. Le nazioni principali produttrici sono Cina, Canada, Australia, Perù, USA ed India. Quando la Terra si formò lo Zn venne depositato come solfuro (ZnS) ed estratto dalle miniere con il nome di sfalerite negli USA e blenda in Europa. La struttura è simile a quella del diamante con metà delle posizioni occupate da S e metà dallo Zn o da qualche altro metallo come il ferro ($(ZnFe)S$) che si trova comunemente associata alla galena PbS . L'erosione idrotermale ha dato origine a depositi di carbonati e silicati. Un altro minerale importante è lo $ZnCO_3$.

Estrazione ed Usi

I minerali di Zn (essenzialmente ZnS) vengono concentrati per flottazione, quindi arrostiti all'aria per dare ZnO e SO₂, dove l'anidride solforosa è impiegata nella produzione di H₂SO₄.

Lo Zn è ottenuto dall'ossido attraverso due differenti processi:

1. Riduzione con CO a 1200°C in forno. A questa temperatura lo Zn è gassoso, pertanto se la miscela gassosa di Zn e CO₂ è semplicemente allontanata e raffreddata si può andare incontro a parziale riossidazione dello Zn. Esistono pertanto due modi per evitare che ciò possa accadere: (a) usare un eccesso di carbone in modo che la CO₂ formata viene convertita in CO, (b) raffreddando rapidamente i gas in allontanamento dal forno in modo che non possano raggiungere l'equilibrio.
2. Lo ZnS è riscaldato in aria a temperatura più bassa ottenendo ZnO e ZnSO₄ che poi verranno sciolti in H₂SO₄ e la miscela elettrolizzata per produrre Zn puro.

Lo Zn è utilizzato in grandi quantità per ricoprire il ferro evitandone l'arrugginimento. Tale processo avviene per galvanizzazione o per immersione nello Zn fuso. Nel metodo Sherard l'oggetto è ricoperto di Zn in polvere e successivamente risaldato. Lo Zn è anche impiegato come elettrodo negativo nelle batterie, mentre lo ZnO è usato quale pigmento nelle vernici ma anche nel campo cosmetico. Inoltre, trova ampio impiego nell'industria della gomma poiché il suo impiego ne accorcia i tempi di vulcanizzazione.

La maggior parte dello ZnO è prodotta secondo due processi:

Processo Indiretto

Nel processo indiretto o francese, lo zinco metallico viene fuso in un crogiolo di grafite e vaporizzato a temperature superiori, generalmente intorno ai 1000°C. Il vapore di zinco reagisce con l'ossigeno nell'aria per dare ZnO. Le particelle di ossido di zinco vengono trasportate in un condotto di raffreddamento e raccolte in una sacca. Questo metodo indiretto fu reso popolare da Le Claire (Francia) nel 1844 ed è quindi comunemente noto come processo francese. Il suo prodotto è normalmente costituito da particelle di ossido di zinco agglomerate con una dimensione media da 0,1 a pochi micrometri. La maggior parte dell'ossido di zinco nel mondo è prodotta secondo questo metodo.

Processo Diretto

Il processo diretto o americano inizia con diversi composti di zinco contaminati, come minerali di zinco o sottoprodotti della fonderia. I precursori di zinco vengono ridotti attraverso riduzione carbotermica. La fonte di carbonio è generalmente antracite e si produce vapore di zinco, che viene quindi ossidato come nel processo indiretto. A causa della minore purezza del materiale di base, anche il prodotto finale è di qualità inferiore nel processo diretto rispetto a quello indiretto.

3. Scopo

L'attività boosterizzante di una molecola impiegata nella protezione solare è cosa ampiamente conosciuta e studiata in campo cosmetico. Il successo di queste classi di sostanze funzionali risiede nella possibilità di un impiego decisamente più limitato di filtro solare (notoriamente costoso) e nella possibilità di incrementare notevolmente il valore di SPF raggiungendo valori altrimenti impossibili mantenendo le concentrazioni di filtro nei limiti imposte dalla legislazione.

Ultimamente una nuova classe di Booster ha fatto la sua comparsa sul mercato proprio grazie al lavoro di ricerca compiuto nei laboratori del gruppo del prof. Manfredini. Si tratta di molecole multifunzionali che presentano l'effetto booster coadiuvato ad una importante attività antiossidante; tali peculiarità finora mai coesistite in questa classe di molecole hanno fatto dell'Oxisol[®] (INCI: Dhydroxyphenyl Benzimidazole Carboxylic Acid) una molecola unica nel suo genere.

Il lavoro di ricerca svolto in questo percorso di dottorato innalza ulteriormente il grado di innovazione nel campo della protezione solare. Filtri fisici quali TiO₂ e ZnO sono stati rivestiti con molecole organiche, tra cui anche l'Oxisol[®]. Tale processo ha consentito di ottenere un nuovo materiale dalle caratteristiche uniche e migliorative rispetto al filtro uncoated o semplicemente rivestito con molecole alifatiche. Il miglioramento è stato verificato non solo in termini di efficacia ma anche di sicurezza. Per la prima volta, nel campo della cosmetica, non si parla più di Booster quale semplice ingrediente accessorio di una formulazione, bensì di parte integrante di una classe di filtri di nuova generazione.

Lo scopo del lavoro condotto in questi anni è stato pertanto lo studio delle migliori strategie di sintesi per ottenere i coating di TiO₂ e ZnO e quindi lo studio delle proprietà degli addotti ottenuti. Questi studi si sono articolati in più fasi. Dapprima è stato caratterizzato il nuovo materiale attraverso spettroscopia FT-IR ed analisi termogravimetrica (TGA), quindi si è proceduto attraverso studio dell'efficacia e della sicurezza. L'efficacia è stata confermata tramite determinazione dell'SPF secondo metodica (ISO 24443:2012), misura del potenziale Z e determinazione della velocità di sedimentazione, la sicurezza, invece, è stata valutata tramite lo studio della citotossicità e della fotocatalisi.

L'attività fotocatalitica dei filtri solari, in particolare, è stata dimostrata ripercuotersi sulla vitalità delle cellule: da differenti studi, infatti, emerge che le particelle di TiO₂ e ZnO

inducono stress ossidativo nelle cellule, disturbando l'equilibrio fra processi intracellulari ossidativi e antiossidativi. Queste evidenze sono state confermate in questo studio comparando i dati degli studi di citotossicità con i risultati dei vari test fotocatalitici²⁶.

I filtri solari impiegati nel seguente lavoro sperimentale sono il TiO₂ e ZnO. Una caratterizzazione di queste molecole è stata eseguita attraverso tecniche di microscopia elettronica al fine di interpretarne meglio i comportamenti.

Per concludere si è deciso di eseguire uno studio esplorativo sulla funzionalizzazione del TiO₂ con Avobenzone. In differenti paesi l'associazione di queste due molecole è infatti proibita a causa del noto potere fotocatalitico dell'ossido di metallo congiunto alla spiccata fotoinstabilità del filtro chimico. Il coating è stato ottenuto con successo e si è quindi proceduto alla caratterizzazione ed all'analisi dell'attività fotocatalitica del nuovo materiale, dalla quale è risultata una forte inibizione dell'attività fotocatalitica. In questo caso, al fine di intuire il meccanismo di inibizione dell'attività fotocatalitica, lo studio è stato condotto prima vagliando gli effetti della radiazione UV, quindi quelli della radiazione visibile. Si è potuto verificare che il rivestimento svolge un ruolo determinante nell'abbattimento della fotocatalisi quando la radiazione incidente è quella UV. Il contrario, invece, accade nel caso della radiazione visibile: seppur di molto poco, l'attività fotocatalitica è più pronunciata nel caso del coating. Questi risultati permettono di spiegare meglio il ruolo del rivestimento nell'inibizione dei processi di fotocatalisi: infatti, il contributo del legante non è solo sterico (impedendo al reagente di avvicinarsi alla superficie del TiO₂), ma impedisce anche la formazione di h⁺ nella banda di valenza (grazie all'assorbimento della radiazione luminosa) diminuendo drasticamente il potere ossidante dell'ossido. Per concludere, la spettroscopia FT-IR e la letteratura riferita a coating di TiO₂ con molecole simili all'Avobenzone (Curcumina), lasciano ipotizzare che il coating avvenga non attraverso il dchetone, bensì attraverso il cheto-enolo, la forma più stabile dell'Avobenzone, garantendone ulteriore stabilità.

Ciò significa che la coesistenza tra TiO₂ e Avobenzone è possibile se quest'ultimo riveste il primo, anziché essere due ingredienti distinti all'interno della formulazione.

4. Materiali e metodi

4.1. Strumenti e reagenti

Avobenzene (BASF, Ludwigshafen, Germany), Silica (Evonik, Essen, Germany), Ferulic Acid (A.C.E.F., Fiorenzuola D'Arda PC, Italy), Titanium Dioxide (BASF, Ludwigshafen, Germany) Zinc Oxide (EverZinc, Liège, Belgium), Oxisol[®] (Kalichem, Brescia, Italy), Acid Blue 9 (Farmalabor, Milan, Italy), Ethanol BioUltra, for molecular biology, ≥99.8% (absolute alcohol, without additive) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), Physiological solution 0.9% NaCl (S.A.L.F. Spa, Bergamo, Italy), UV-Vis spectrophotometer Jasco V-730 (Jasco, Mary's Court Easton, USA), FT-IR spectrophotometer ATR FT-IR Jasco 4600, ATR PRO ONE (Jasco, Mary's Court Easton, USA), Centrifuge RE.MI XS R-8D (REMI, Mumbai, India), Turboemulsifier Silverson[®] L5M-A (Silverson[®], Evry, France), Viscosimeter Brookfield DV2T (Brookfield, Toronto, Canada), Densimeter Mettler Toledo DA-100M (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA), Plaster 5x5 (Leukofix, Hamburg, Germany), Magnetic stirrer (Heidolph, Schwabach, Germany), SHIMADZU UV-2600 spectrophotometer provided of integrating sphere ISR 2600 60 mm, WW5 PMMA plates (Schonberg GmbH, Munich, Germany), Suntest CPSp; (Atlas, Linsengericht, Germany) LUMiSizer[®] (L.U.M.GmbH, Berlin, Germany), Nicomp ZLS Z3000 (PSS, Port Richey, FL, USA). Netzsch 409/C (Gebrüder-Netzsch-Straße 1995100 Selb, Germany), Nicomp ZLS Z3000 (8203 Kristel Circle Port Richey FL, USA), Zeiss Sigma VP Field Emission SEM (Oberkochen, Germany), ICP-MS NexION 350D (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), Discover SP-D oven (CEM Corporation, Matthews, North Carolina, USA),

4.2. Sintesi degli addotti

TiO₂@Oxisol[®]

Questo metodo è stato utilizzato per la funzionalizzazione di due tipi di ossido di titanio: nanometrico (Degussa, composto da una miscela di Anatasio: Rutilo 3: 1) e non nanometrico (Anatasio: Rutilo 1: 2). In un matraccio da 250 ml a due colli, sono stati aggiunti 1,0 g di TiO₂ in 100 ml di etanolo; questa miscela è stata posta sotto continua agitazione e termostata a 50 °C, avendo cura di avvolgere il pallone in carta stagnola al fine di evitare

reazioni fotocatalitiche parassite. Si aggiunge 1,0 g di Oxisol[®] solubilizzato in 50 mL di etanolo, goccia a goccia per mezzo di un imbuto, terminata l'aggiunta l'agitazione continua per altre 2 ore. Al fine di valutare il decorrere della reazione di funzionalizzazione, viene eseguita un'analisi spettrofotometrica del surnatante tramite spettroscopia UV-Vis. La preparazione del campione è stata preparata prelevando 5 mL di miscela di reazione, centrifugandola per 10 minuti a 6000 rpm e campionando dal surnatante. Dopo filtrazione di questi con filtro da 0,45 micron, 100 µl di questa soluzione sono stati portati a volume in un pallone da 100 ml con etanolo. Della soluzione così ottenuta sono stati prelevati 3 mL, posti in cuvetta, quindi analizzati spettrofotometricamente. L'analisi è stata eseguita a intervalli regolari di due ore per le prime 3 volte, mentre l'analisi finale è stata condotta al termine delle 24 ore. Alla fine della reazione, la soluzione è stata dapprima centrifugata eliminando la fase liquida. Il solido è stato invece lavato due volte con acqua distillata (fino a perfetta trasparenza e nessuna colorazione del liquido), quindi essiccato a 90°C fino a raggiungimento del peso costante. Il prodotto essiccato viene quindi analizzato attraverso spettroscopia FT-IR.

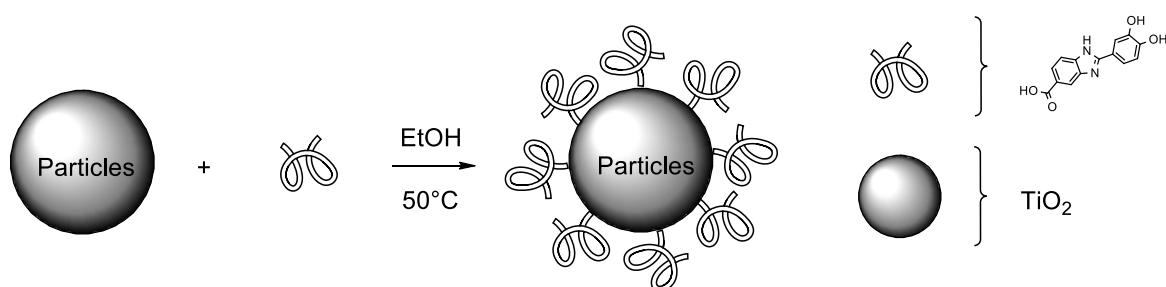


Figura 33. Generico schema di reazione per l'addizione di Oxisol[®] a TiO₂.

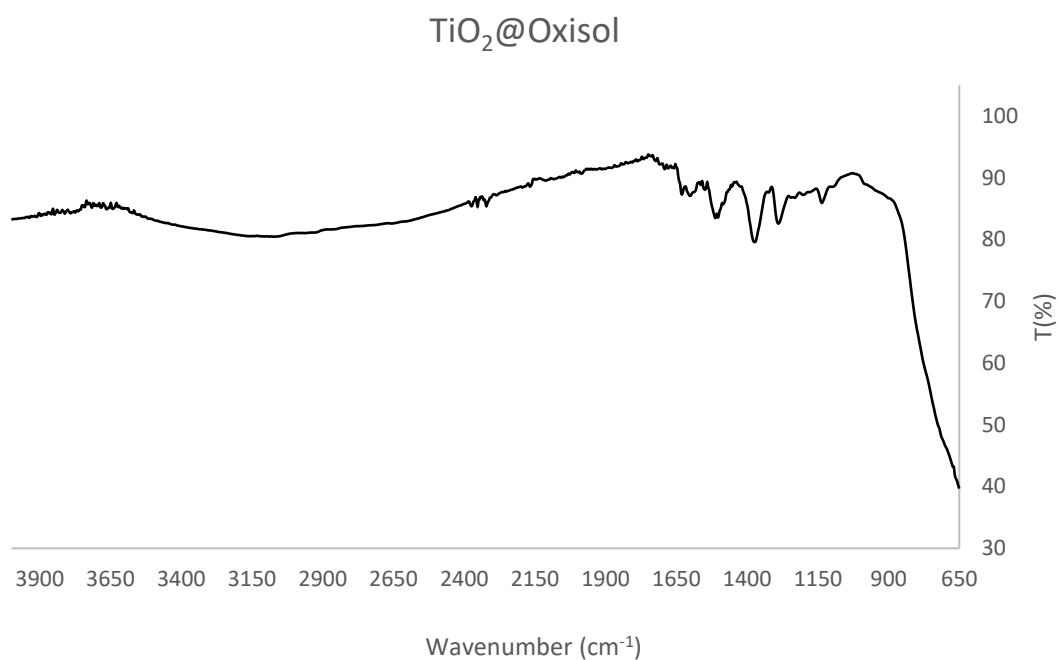


Figura 34. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione del TiO₂ non nanometrico con Oxisol[®].

La presenza contemporanea del carbossile e scomparsa dei picchi riferiti alle funzionalità catecoliche lascia ipotizzare che la funzionalizzazione dell'Oxisol[®] al diossido di titanio non sia chemoselettiva ma possa esprimersi attraverso una duplice via, cioè sia attraverso la funzionalità catecolica sia quella carbossilica. Dalla letteratura è nota l'affinità dei gruppi carbossilici e catecolici al diossido di titanio²⁷. Diminuzione del picco ν (C=O) a 1750 cm⁻¹, scomparsa del segnale ν (COO-H/O-H monomero) a 3600/3300 cm⁻¹ e δ (COO-H) a 1440-1395 cm⁻¹. Scomparsa di δ (OH alcohol) 1420-1330 cm⁻¹. La medesima interpretazione vale per la versione nanometrica del TiO₂.

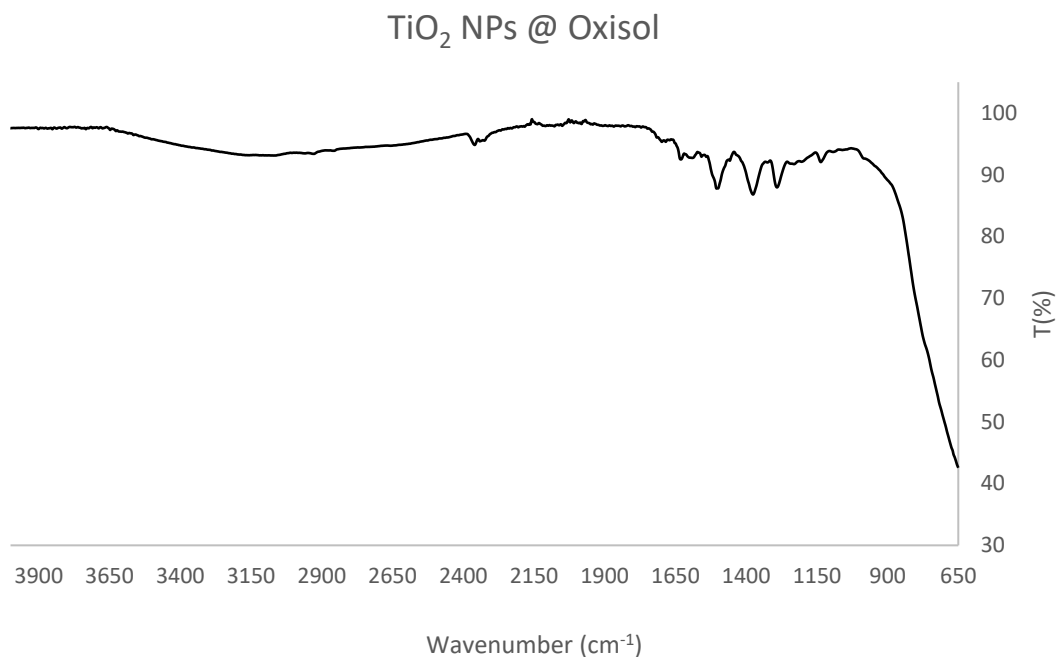


Figura 35. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione del TiO₂ nanometrico con Oxisol®

ZnO funzionalizzato con Oxisol® (ZnO-Ox)

Anche per lo ZnO il metodo è paragonabile a quello del TiO₂, con la differenza che in questo caso lo ZnO è aggiunto alla soluzione di etanolo in cui l'Oxisol® è stato presolubilizzato: in un pallone da 250 ml a due colli con un condensatore a bolle, 0,269 g di Oxisol® sono solubilizzati in etanolo, mantenendo la temperatura intorno ai 50 °C. Dopo aver avvolto il pallone con carta stagnola (per evitare reazioni fotocatalitiche), si aggiunge il filtro fisico e si lascia in agitazione la miscela per almeno un'ora. La reazione è stata monitorata tramite spettroscopia UV-Vis ed è stata eseguita la caratterizzazione IR in seguito a lavaggi ed essiccamento, come descritto nel caso del TiO₂.

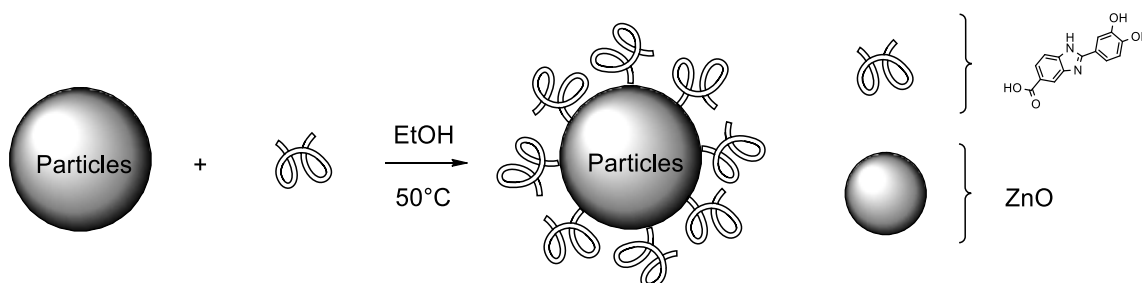


Figura 36. Generico schema di reazione per l'addizione di Oxisol® a ZnO.

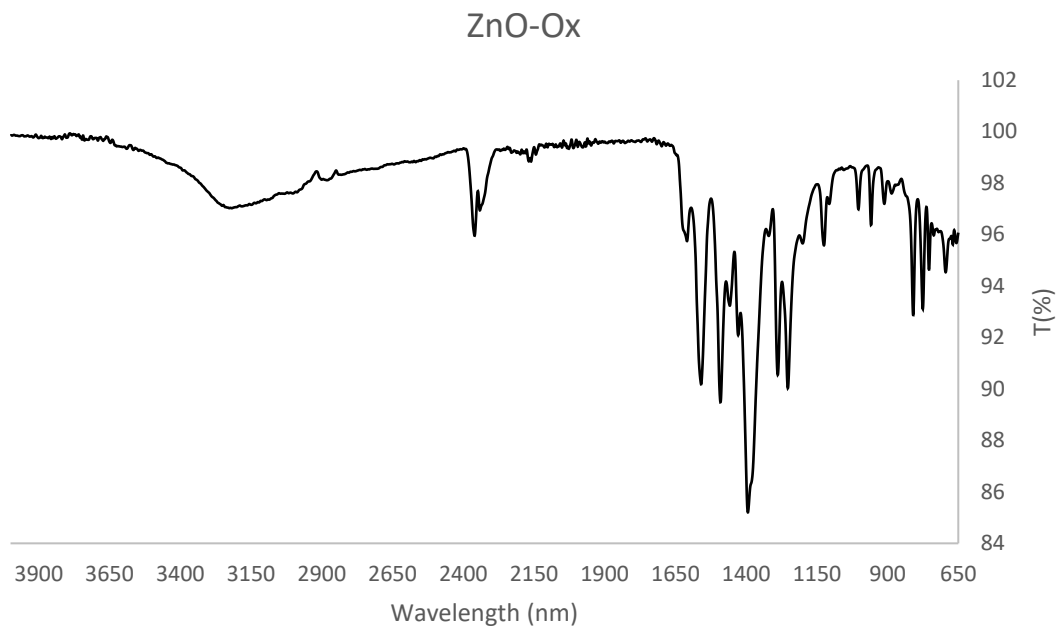


Figura 37. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione del ZnO non nanometrico con Oxisol®

Può essere notata la scomparsa del singoletto relativo allo stretching $\nu(\text{C}=\text{O})$ a 1750 cm^{-1} riferito all'acido carbossilico puro e del δ ($\text{COO}-\text{H}/\text{O}-\text{H}$ monomero). Sono inoltre osservabili gli stretching antisimmetrico $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ nella regione tra 1400 e 1500 cm^{-1} e simmetrico $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ a 1373 cm^{-1} . La stessa interpretazione può essere condotta per lo ZnO nanometrico.

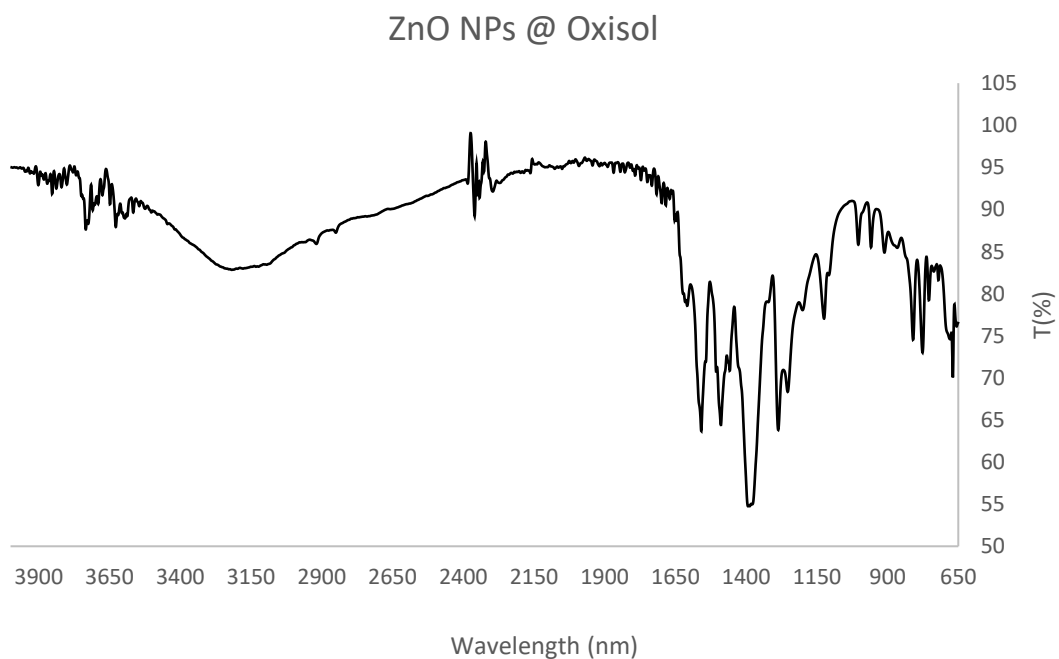


Figura 38. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione del ZnO nanometrico con Oxisol®

Complesso Zn^{2+} -Oxisol[®]

La sintesi era basata sul metodo Singh et al²⁸. In un matraccio da 250 ml a due colli, 0,5 g di Oxisol[®] sono stati solubilizzati in acqua con 2 equivalenti di NaOH. A solubilizzazione completa, sono stati aggiunti 3 equivalenti di $ZnCl_2$ (0,757 g). Si osserva la formazione di un precipitato marrone chiaro. La reazione è stata fatta procedere per 24 ore, al termine delle quali si procede alla centrifugazione, essiccazione e caratterizzazione tramite FT-IR.

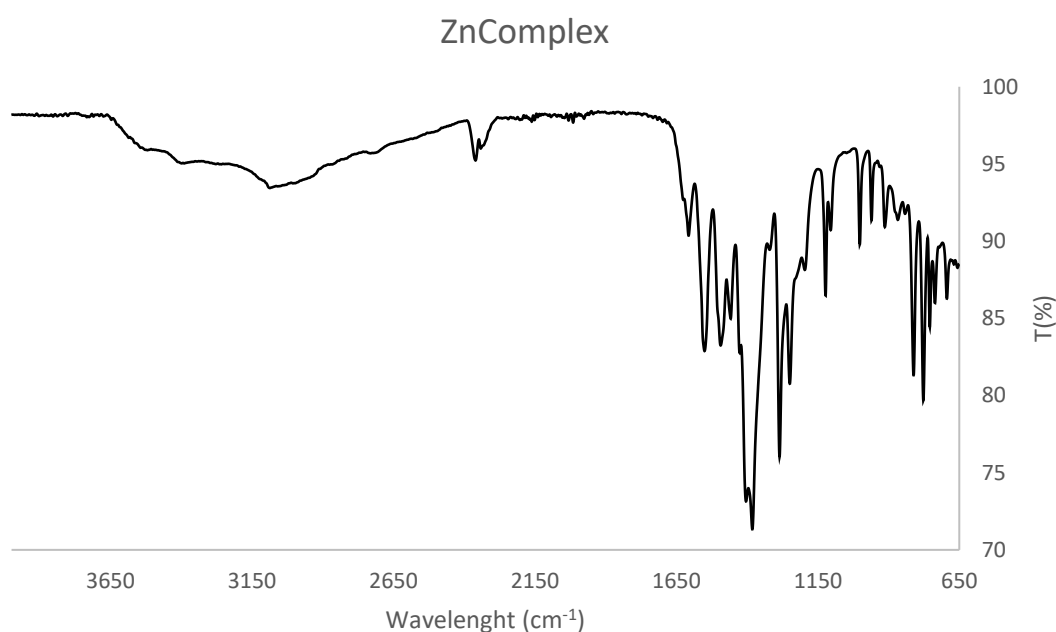


Figura 39. Spettro FT-IR relativo alla complessazione dello zinco con Oxisol[®]. Non sono naturalmente evidenti i segnali relativi al segnale Zn-O

Scomparsa del singoletto relativo al δ (COO-H/O-H) del monomero e allo stretching ν (C=O) a 1750 cm^{-1} riferito all'acido carbossilico puro. Gli stretching antisimmetrico ν_{as} (COO⁻) nella regione tra 1400 e 1500 cm^{-1} e simmetrico ν_s (COO⁻) a 1373 cm^{-1} sono evidenti.

SiO₂@Oxisol[®]

Il procedimento è il medesimo descritto per i precedenti addotti: in un pallone a due colli con condensatore a bolle sono stati caricati 150ml di etanolo, quindi e disciolti 1g di Oxisol[®]. A solubilizzazione raggiunta è stato aggiunto gradualmente e sotto continua agitazione 1g di SiO₂⁻ nanometrica e la reazione è proseguita per 24h a 50°C. La caratterizzazione è avvenuta tramite spettroscopia IR e monitorata attraverso UV-Vis.

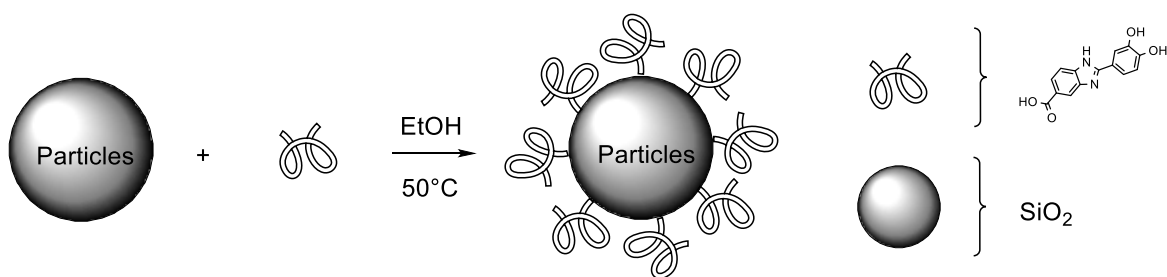


Figura 40: schema di reazione per la funzionalizzazione di SiO₂ con Oxisol®

Nonostante la spettroscopia IR abbia evidenziato la presenza degli stretching antisimmetrico ν_{as} (COO⁻) nella regione tra 1400 e 1500 cm⁻¹ e simmetrico ν_s (COO⁻) a 1373 cm⁻¹, alla base dell'avvenuta funzionalizzazione, la polvere ottenuta è risultata estremamente disomogenea con zone di elevata densità e difficilmente maleabili. Si è tentato di impiegare comunque il materiale ottenuto in emulsione, tuttavia ne è risultato un prodotto finito di scarsa qualità con evidenti sospensioni. Questo ci ha costretto ad abbandonare l'utilizzo di tale addotto per le analisi successive.

TiO₂/ZnO@Acido Ferulico

In un pallone a due colli con condensatore a bolle sono stati caricati 150ml di etanolo e disciolto 1g di Acido Ferulico. A solubilizzazione raggiunta è stato aggiunto gradualmente e sotto continua agitazione 1g di ossido di metallo e la reazione è proseguita per 24h a 50°C.

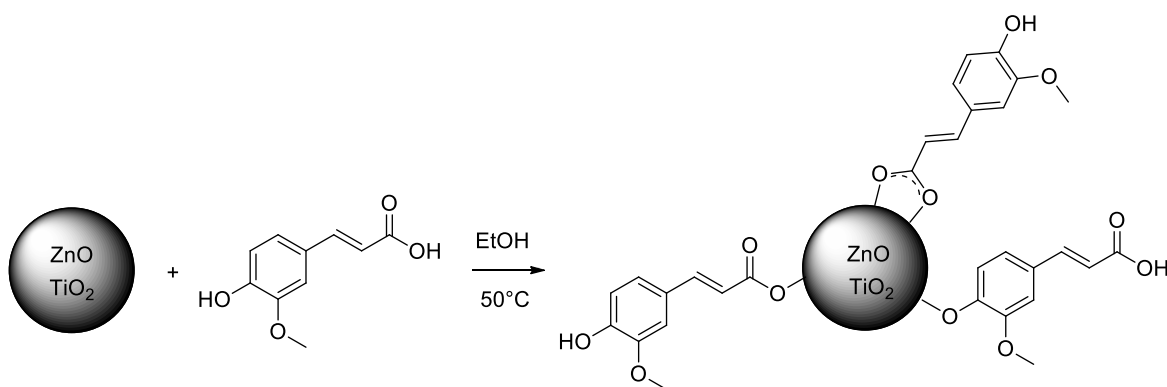


Figura 41. Generico schema di reazione per l'addizione di acido ferulico a TiO₂ e ZnO.

Le miscele di reazione contenenti gli ossidi addizionati all'Acido Ferulico vengono separatamente centrifugati e lavati, quindi il tutto essiccato in stufa a 90°C.

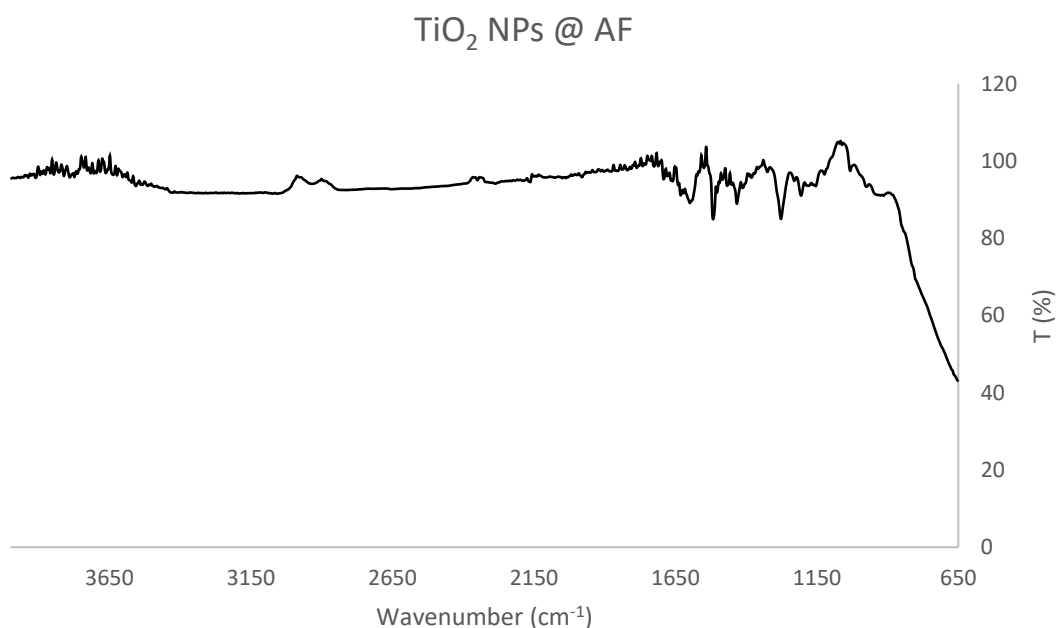


Figura 42. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione del TiO_2 nanometrico con Acido Ferulico

È evidente la scomparsa del segnale relativo allo stretching dell'ossidrile fenolico (a circa 3000 cm^{-1}), inoltre si osserva una diminuzione del picco a 1700 cm^{-1} , attribuibile allo stretching C=O della funzionalità carbossilica. Questo è indice di una possibile coordinazione anche attraverso il gruppo carbossilato dell'Acido Ferulico. Analoga interpretazione per lo spettro del TiO_2 non nanometrico.

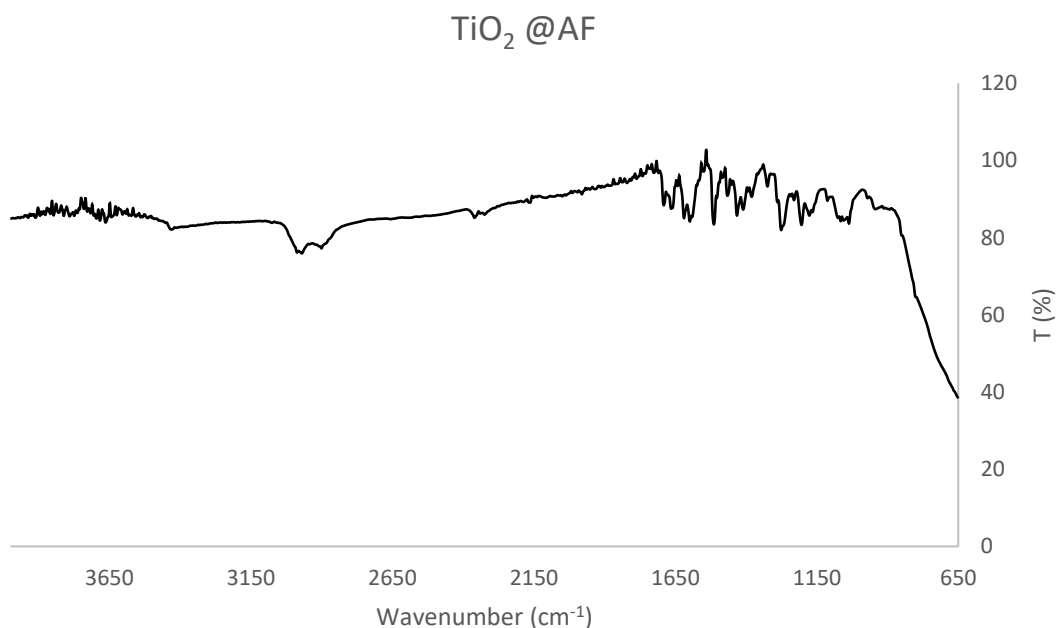


Figura 43. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione del TiO_2 non nanometrico con Acido Ferulico

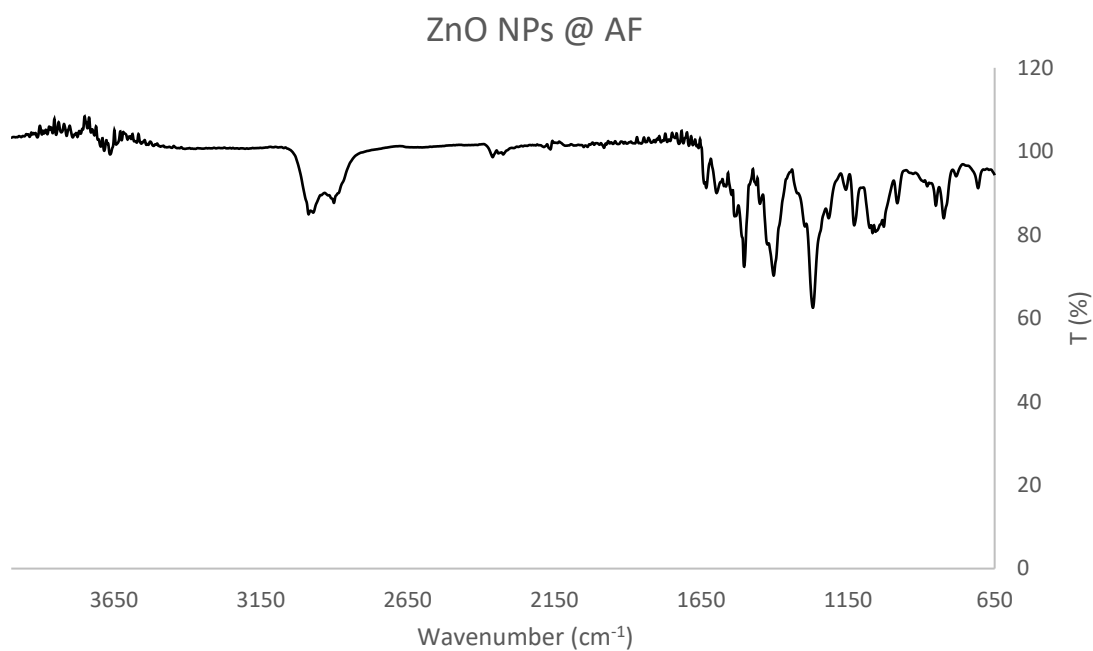


Figura 44. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione di ZnO nanometrico con Acido Ferulico

La **Figura 44** conferma le stesse informazioni ricavate dagli spettri IR degli addotti tra biossido di Titanio e Acido Ferulico: in ZnO nano@AF è evidente la scomparsa del segnale relativo all'ossidrile alcolico (3000 cm^{-1}) e la diminuzione del picco a 1700 cm^{-1} , indice di una possibile coordinazione attraverso il gruppo carbossilato. La stessa interpretazione può essere condotta per lo ZnO non nanometrico.

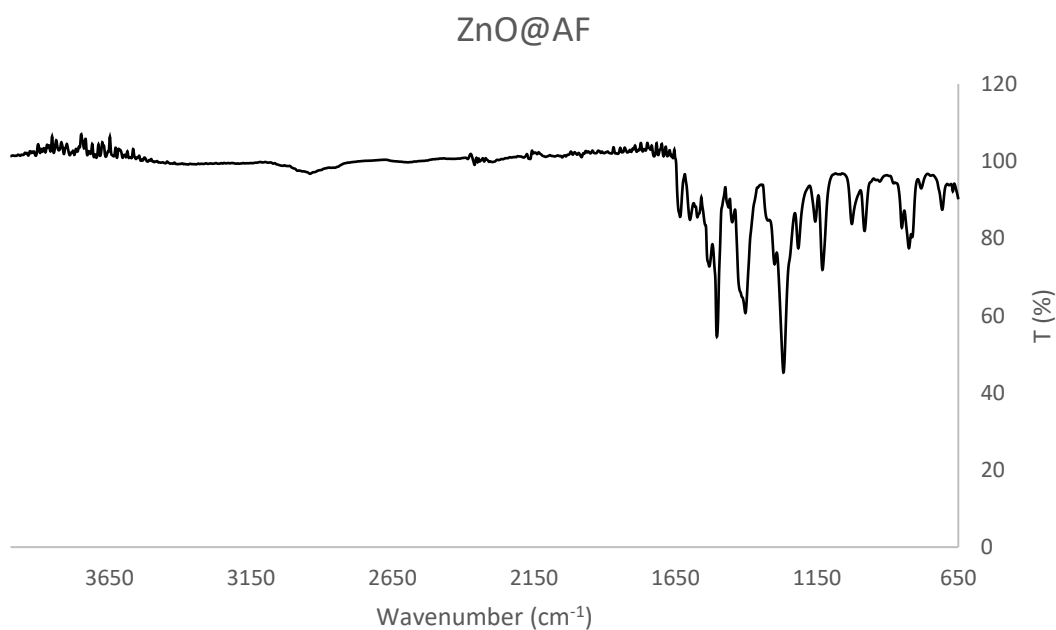


Figura 45. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione di ZnO non nanometrico con Acido Ferulico

TiO₂/ZnO@Acido Ellagico

In un pallone a due colli con condensatore a bolle sono stati caricati 150 ml di acqua deionizzata e 5 ml di TEA, nella miscela così basificata è stato quindi disciolto 1g di Acido Ellagico. A solubilizzazione raggiunta è stato aggiunto gradualmente e sotto continua agitazione 1g di ossido di metallo e la reazione è proseguita per 24h a 50°C.

Al termine delle 24 ore il prodotto è stato centrifugato, lavato due volte con etanolo e quindi essiccato.

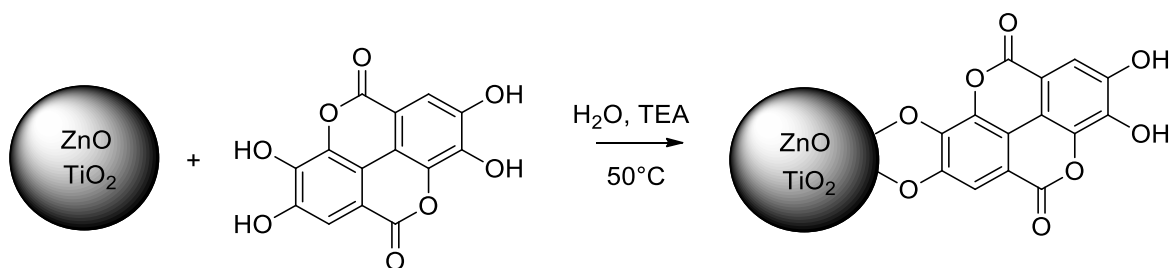


Figura 46. Generico schema di reazione per l'aggiunta di acido ellagico a TiO₂ e ZnO.

Le miscele di reazione contenenti gli ossidi addizionati all'Acido Ellagico vengono sempre ripartite in provette da centrifuga e sottoposte ad un primo ciclo di centrifugazione. Quindi si elimina il surnatante (acqua basica per TEA) e si lava il precipitato tramite aggiunta di etanolo in modo tale da creare un azeotropo di minimo per facilitare la successiva evaporazione del solvente ed eliminare i residui di TEA. Quindi si svolge un secondo giro di centrifuga eliminando nuovamente il surnatante (ora costituito da etanolo), mentre il deposito viene stoccato in stufa a 90°C.

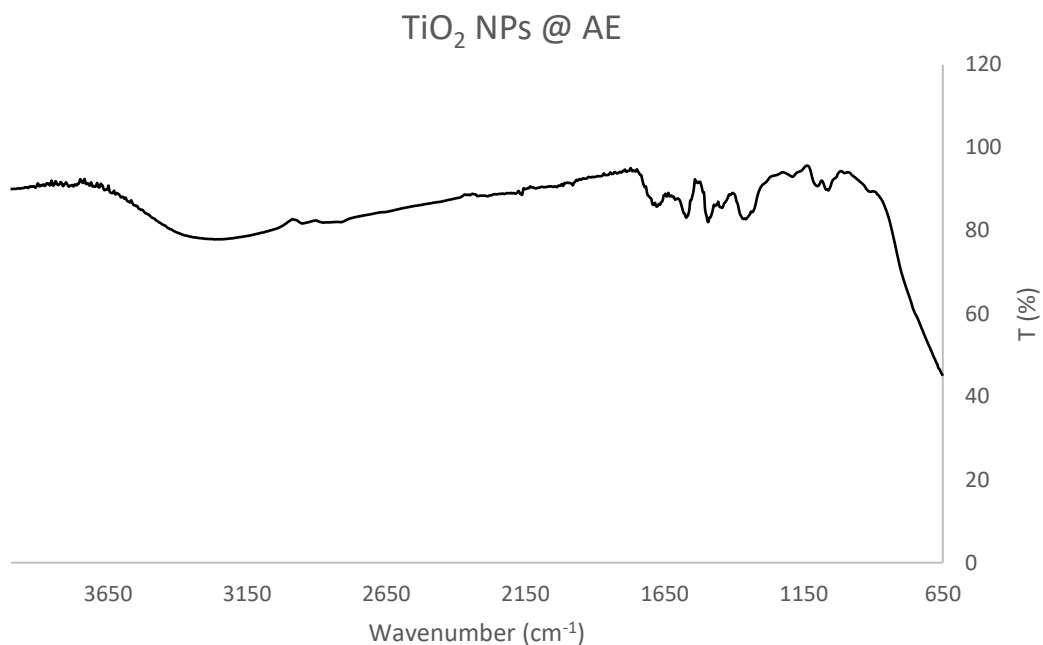


Figura 47. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione di TiO_2 nanometrico con Acido Ellagico

Si nota una scomparsa dei segnali relativi ai gruppi -OH, i quali, però, come sarà descritto nel capitolo 5.5 saranno riconducibili alla trietanol ammina e non ad una vera e propria funzionalizzazione. Lo stesso ragionamento vale per il TiO_2 non nanometrico.

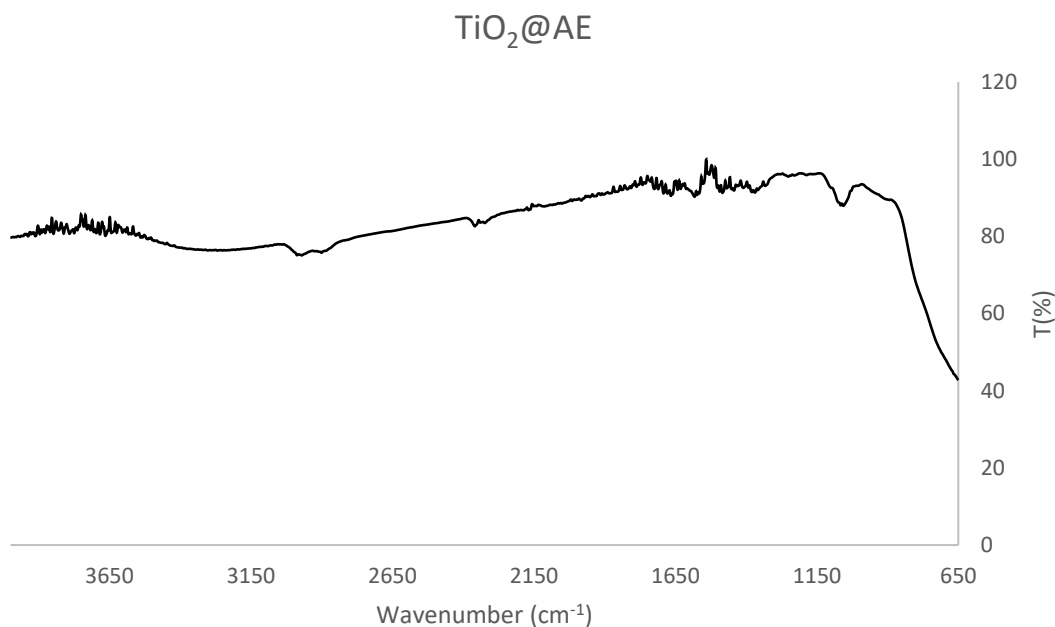


Figura 48. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione di TiO_2 non nanometrico con Acido Ellagico

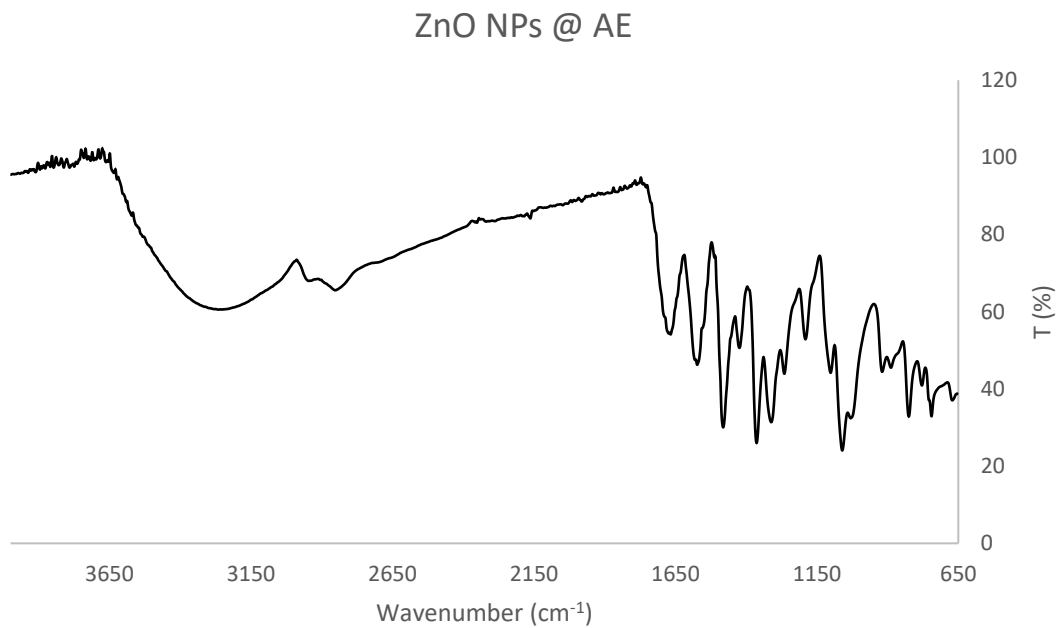


Figura 49. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione di ZnO nanometrico con Acido Ellagico

Per l'addotto ZnO non nano@AE, si osserva la sparizione dei picchi relativi allo stretching degli O-H liberi del catecolo. Anche in questo caso il discorso sarà approfondito nel capitolo 5.5.

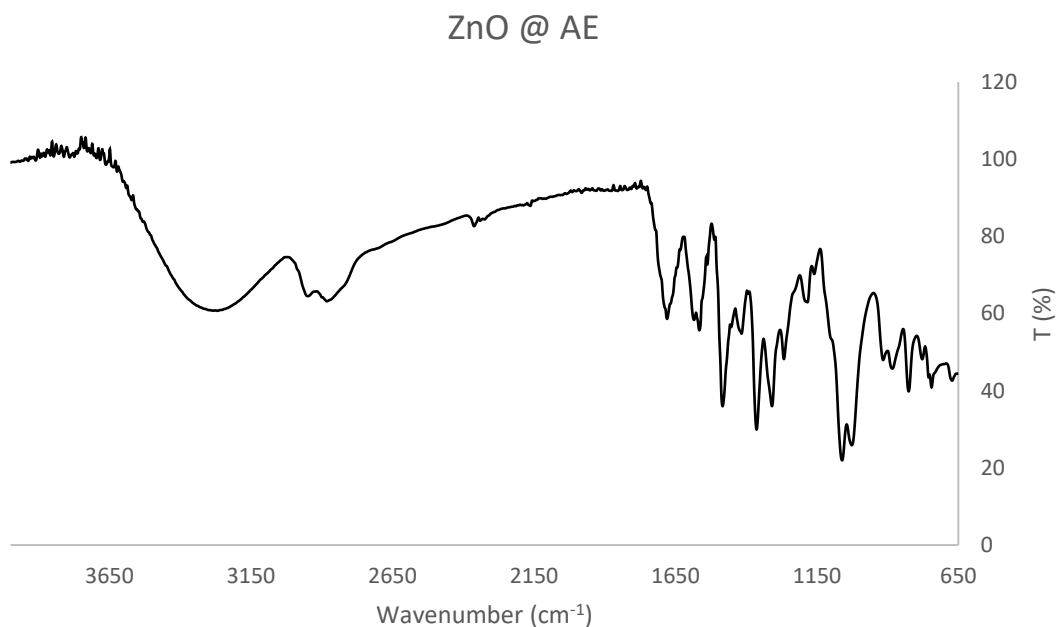


Figura 50. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione di ZnO non nanometrico con Acido Ellagico

n-TiO₂/n-ZnO@Avobenzone

Il procedimento ricalca quello adottato per l'acido ferulico: in un pallone a due colli con condensatore a bolle sono stati caricati 150ml di etanolo, quindi e disciolti 1g di Avobenzone. A solubilizzazione raggiunta è stato aggiunto gradualmente e sotto continua agitazione 1g di TiO₂ Degussa o ZnO nanometrico e la reazione è proseguita per 24h a 50°C.

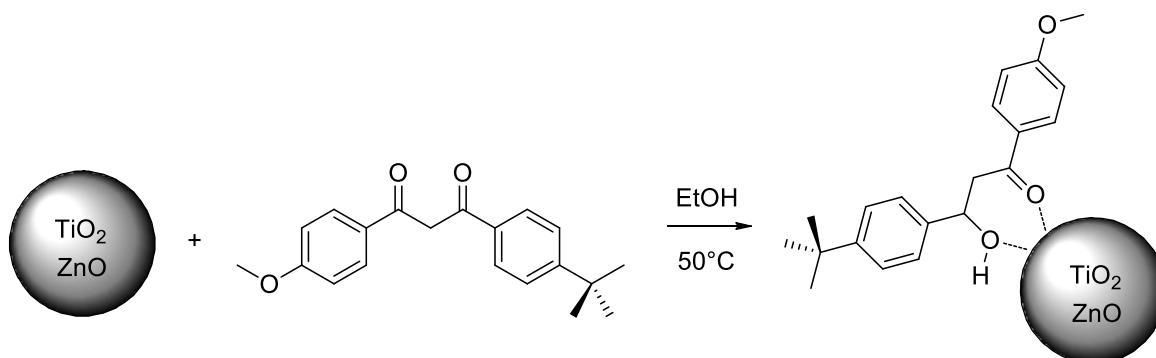


Figura 51. Generico schema di reazione per l'aggiunta di Avobenzone a TiO₂ e ZnO.

Le miscele di reazione sono infine centrifugate, lavata ed essiccata tramite stoccaggio in stufa a 90°C.

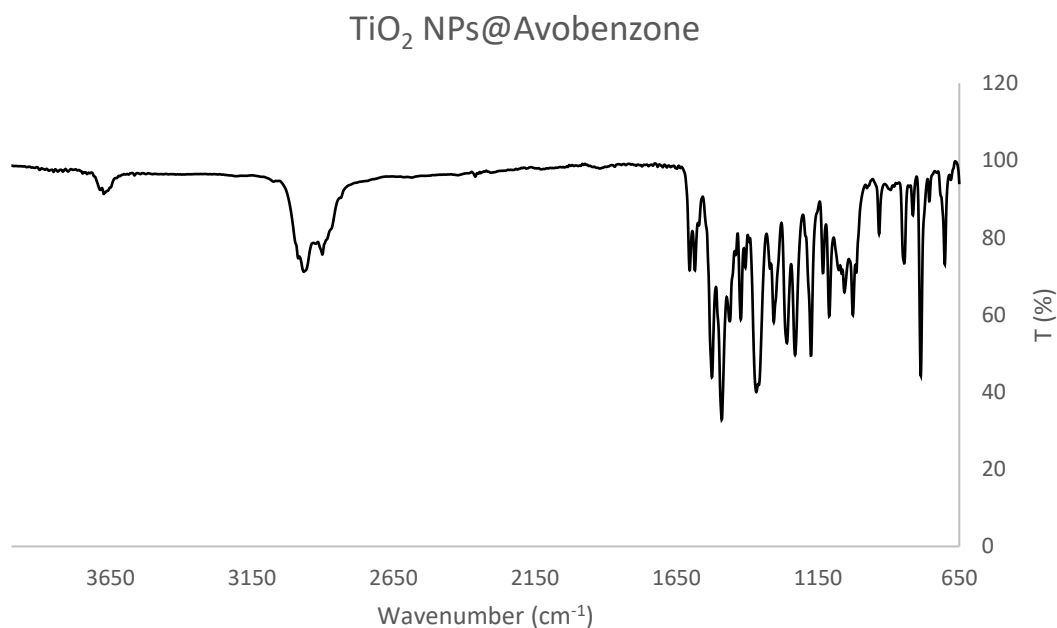


Figura 52. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione di TiO₂ nanometrico con Avobenzone

Il TiO_2 non rivestito mostra solitamente un picco di assorbimento ampio e forte al di sotto di 800 cm^{-1} che è caratteristico della vibrazione di stretching del legame Ti-O. Un'ampia banda a 3700 cm^{-1} è correlata allo stiramento di O-H del gruppo funzionale idrossile e il picco a 1634 cm^{-1} è attribuito al bending della superficie H-OH (Zhou et al. 2012)²⁹. Il campione di TiO_2 rivestito sembra molto simile a quello dello spettro non rivestito, ad eccezione del picco forte e ampio a $400\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ che sembra aumentare la sua ampiezza. Poiché questa regione è caratterizzata dallo stiramento del Ti-O, è possibile che l'effetto dell'aumento dell'ampiezza sia dovuto alla debole interazione chimica tra avobenzone e TiO_2 .

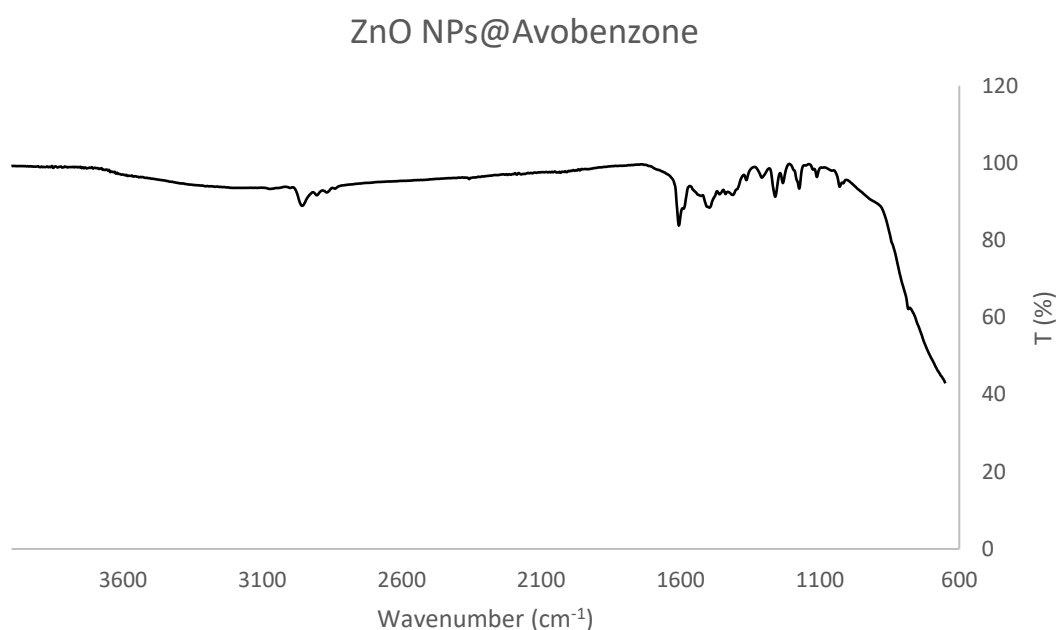


Figura 53. Spettro FT-IR relativo alla funzionalizzazione di ZnO nanometrico con Avobenzone

Lo spettro FT-IR di ZnO nano mostra un'ampia banda dovuta all'umidità dell'acqua a 3500 e 1633 cm^{-1} e l'assorbimento tipico del legame Zn-O inferiore a 600 cm^{-1} . Caratteristiche simili si possono trovare nell'addotto n-ZnO@Avobenzone insieme a una serie di picchi attribuibili alla parte organica del composto.

La posizione dei picchi dell'addotto è diversa da quella di Avobenzone, ciò potrebbe indicare la formazione di un legame chimico tra la molecola organica e l'ossido di zinco. Maggiori approfondimenti sono esplicitati al capitolo 5.6 e 5.7.

4.3. Formulazioni

TiO₂@Oxisol[®] and ZnO with Oxisol[®] (ZnO-Ox)

Lo studio è stato condotto su differenti emulsioni. Le formulazioni contenenti Oxisol[®] sono state preparate in modo tale che questa molecola fosse contenuta almeno allo 0.5%, concentrazione minima affinché si verifichi l'effetto booster.

Le emulsioni O/W sono state preparate utilizzando un turboemulsore, nello specifico per questa operazione è stato utilizzato il turboemulsionatore Silverson[®] L5M-A (Silverson[®], Evry, Francia).

L'emulsione base impiegata è stata la stessa al fine di minimizzare gli errori e la composizione qualitativa delle formulazioni è di seguito riportata:

Fase A: Steareth-21, Steareth-2, Glyceryl Mono Stearate, Alcool cetearilico, Acido benzilico-deidroacetico, Cocco-Caprilato, Acido carbossilico diidrossifenilbenzimidazolo (Oxisol[®]) (quando richiesto);

Fase B: ZnO/TiO₂ nanometrico oppure ZnO/TiO₂ non nanometrico oppure ZnO-Ox/ TiO₂@Oxisol[®] nanometrico oppure ZnO-Ox/ TiO₂@Oxisol[®] non nanometrico;

Fase C: pantenolo, NaOH, gomma di xanthana, acqua.

La formulazione di base è stata preparata aggiungendo gli ingredienti della fase A ad eccezione del sistema conservante (alcool benzilico, acido deidroacetico), Oxisol[®] (quando richiesto) e Coco-Caprylate, quindi riscaldando fino a fusione. In un becher a parte, è stata preparata la fase C aggiungendo il 90% di acqua (riscaldata fino a 80-90 ° C) e miscelando fino alla completa solvatazione della gomma di xanthana. Quando ognuna delle due fasi ha raggiunto la temperatura di 80 ° C, la fase A viene aggiunta alla fase C sotto miscelazione continua. La base ottenuta è stata mantenuta a 70°C pronta per essere funzionalizzata.

La funzionalizzazione delle formulazioni è stata eseguita in modo differente a seconda della sostanza funzionale da aggiungere. Si possono distinguere due approcci differenti:

- a. *Formulazioni senza Oxisol[®]*: la fase B è stata aggiunta al Coco-Caprylate, quindi accuratamente miscelata fino ad ottenimento di una dispersione omogenea. Sotto continuo mescolamento, la dispersione viene quindi aggiunta gradualmente alla formulazione di base; la miscela così ottenuta è sottoposta a turboemulsore fino ad

ottenimento di un'emulsione omogenea. Infine, è stata aggiunta l'acqua rimanente e la miscela omogeneizzata nuovamente.

- b. *Formulazione contenente Oxisol[®] da solo o come ZnO-Ox/TiO₂@Oxisol[®]*: la fase B è stata miscelata con Coco-Caprylate come riportato al punto a. In un becher separato l'Oxisol[®] è stato solubilizzato in acqua mediante neutralizzazione con NaOH. Sotto miscelazione continua, la dispersione di polvere è stata aggiunta alla formulazione di base ed infine è stata aggiunta anche la soluzione Oxisol[®].

Sono stati valutati il pH e la viscosità di ciascun preparato. Il valore di pH delle emulsioni desiderato è compreso tra 5,5 e 6,5. Se necessario, il pH è stato corretto con l'aggiunta di acido citrico.

Formulazione	pH	Viscosità (η)
Solo ZnO	6.53	11 230 cPs
ZnO + Oxisol (miscela)	6.67	29 520 cPs
ZnO funzionalizzato (ZnO-Ox)	6.50	39 650 cPs
Solo ZnO nanometrico	6.68	14 160 cPs
ZnO nanometrico +Oxisol (miscela)	6.50	16 420 cPs
ZnO nanometrico funzionalizzato (ZnO-Ox)	6.00	17 860 cPs

Tabella 10. Parametri chimico fisici per ogni formulazione ottenuta con lo ZnO.

Formulazione	pH	Viscosità (η)
Solo TiO₂	5.36	20 590 cPs
TiO₂ + Oxisol[®] (miscela)	5.41	15 840 cPs
TiO₂ funzionalizzato (TiO₂@Oxisol[®])	5.48	28 460 cPs
Solo TiO₂ nanometrico	5.30	45 700 cPs
TiO₂ nanometrico + Oxisol[®] miscela	6.24	25 630 cPs
TiO₂ nanometrico funzionalizzato (n-TiO₂@Oxisol[®])	6.50	34 900 cPs

Tabella 11. Parametri chimico fisici per ogni formulazione ottenuta con lo TiO₂.

TiO₂ and ZnO @ Acido Ferulico o Acido Ellagico

Anche per queste serie di emulsioni, come per quelle precedentemente riportate contenenti Oxisol[®], è stato mantenuto il medesimo scheletro formulativo. È stata dapprima preparata una base comune e quindi funzionalizzata di volta in volta.

Fase A: Steareth-21, Steareth-2, Glyceryl Mono Stearate, Alcool cetearilico, Acido benzilico-deidroacetico, Cocco-Caprilato.

Fase B: ZnO/TiO₂ nanometrico oppure ZnO/TiO₂ non nanometrico oppure ZnO@Acido Ferulico/TiO₂@Acido Ferulico nanometrico oppure ZnO@Acido Ferulico/TiO₂@Acido Ferulico non nanometrico oppure ZnO@Acido Ellagico/TiO₂@Acido Ellagico nanometrico oppure ZnO@Acido Ellagico/TiO₂@Acido Ellagico non nanometrico. Acido Ferulico o Acido Ellagico (quando richiesti)

Fase C: pantenolo, NaOH, gomma di xanthana, acqua.

Il procedimento è lo stesso precedentemente descritto, dove l'Oxisol® è sostituito dagli acidi ellagico e ferulico, inoltre l'acqua è impiegata nella totalità, e non al 90% (gli acidi, infatti, non sono idrosolubili):

- a. *Formulazioni senza Acido Ferulico o Ellagico*: la fase B è stata aggiunta al Coco-Caprylate, quindi miscelata vigorosamente fino ad ottenere una dispersione omogenea. Sotto continua agitazione, la dispersione viene quindi aggiunta gradualmente alla formulazione di base. Avvalendosi del turboemulsore, la miscelazione è proseguita fino ad ottenimento di un'emulsione omogenea.
- b. *Formulazione contenente Acido Ferulico o Ellagico da soli o come coating dello ZnO o TiO₂*: la fase B è stata miscelata con Coco-Caprylate come riportato al punto a. Sotto miscelazione continua, la dispersione di acidi organici puri o coating è stata aggiunta alla formulazione di base ed infine omogeneizzata tramite turboemulsore.

Formulazione	pH	Viscosità (η)
ZnO	6.58	15 200 cPs
ZnO + Acido Ferulico (miscela)	6.70	30 500 cPs
ZnO funzionalizzato (ZnO@AF)	6.49	35 760 cPs
n-ZnO	6.69	15 170 cPs
n-ZnO + Acido Ferulico (miscela)	6.64	18 480 cPs
n-ZnO funzionalizzato (n-ZnO@AF)	6.02	19 880 cPs

Tabella 12. Parametri chimico fisici per ogni formulazione ottenuta con lo ZnO ed Acido Ferulico.

Formulazione	pH	Viscosità (η)
TiO₂	5.55	20 590 cPs
TiO₂ + Acido Ferulico (miscela)	5.24	15 840 cPs
TiO₂ funzionalizzato (TiO₂@AF)	5.40	22 450 cPs
n- TiO₂	5.25	45 690 cPs
n- TiO₂ + Acido Ferulico (miscela)	6.19	28 640 cPs
n- TiO₂ funzionalizzato (n- TiO₂@AF)	6.50	37 090 cPs

Tabella 13. Parametri chimico fisici per ogni formulazione ottenuta con lo TiO₂ ed Acido Ferulico.

Formulazione	pH	Viscosità (η)
ZnO	6.55	11 900 cPs
ZnO + Acido Ellagico (miscela)	6.71	31 300 cPs
ZnO funzionalizzato (ZnO@AE)	6.44	37 990 cPs
n-ZnO	6.77	19 260 cPs
n-ZnO + Acido Ellagico (miscela)	6.55	16 440 cPs
n-ZnO funzionalizzato (n-ZnO@AE)	6.05	20 160 cPs

Tabella 14. Parametri chimico fisici per ogni formulazione ottenuta con lo ZnO ed Acido Ellagico.

Formulazione	pH	Viscosità (η)
TiO₂	5.38	22 100 cPs
TiO₂ + Acido Ellagico (miscela)	5.48	16 300 cPs
TiO₂ funzionalizzato (TiO₂@AE)	5.51	24 150 cPs
n- TiO₂	5.26	48 410 cPs
n- TiO₂ + Acido Ellagico (miscela)	6.36	24 990 cPs
n- TiO₂ funzionalizzato (n- TiO₂@AE)	6.30	35 890 cPs

Tabella 15. Parametri chimico fisici per ogni formulazione ottenuta con lo TiO₂ ed Acido Ellagico.

4.4. Caratterizzazione

FT-IR

Gli spettri FTIR sono stati raccolti nell'intervallo 4000–650 cm^{-1} , con una risoluzione di 5 cm^{-1} a temperatura ambiente utilizzando uno spettrometro Jasco FT/IR-4600 dotato di un singolo accessorio ATR (Jasco ATR PRO ONE). Il numero di scansioni accumulate per ciascuno spettro registrato era automatico con un'esposizione media di circa 1,5 minuti.

TGA/DSC

L'analisi termo-gravimetrica (TGA) e la calorimetria a scansione differenziale (DSC) sono state eseguite simultaneamente con strumento Netzsch 409/C. Il programma di riscaldamento è stato impostato da 30°C a 1000°C, con un aumento di 5°C min^{-1} . I campioni (circa 15 mg) sono stati collocati in un crogiolo di platino/rodio e l'allumina è stata utilizzata per la calibrazione interna. Le misurazioni sono state eseguite in miscela aria/N₂ (40/80 mL/min).

Potenziale ζ (DLS-ELS)

Il diametro idrodinamico è stato misurato per mezzo di un Nicomp ZLS Z3000 multiangolo. Le polveri essiccate sono state nuovamente disperse in acqua ultrapura (10 mg/L) mediante sonificatore a sonda in un bagno di ghiaccio a 200 W per 10 minuti (in modalità pulsata all'80%). Tutte le misurazioni sono state prese dopo un pre-equilibrio di circa 5 minuti. La luce dispersa è stata raccolta con una fibra ottica impostata a un angolo di dispersione di 90° ($W = 25 \text{ mW}$ e $\lambda = 639 \text{ nm}$) per almeno 6 minuti a temperatura ambiente.

La caratterizzazione del potenziale Zeta di Electrophoretic Light Scattering (ELS) è stata eseguita per mezzo di Nicomp ZLS Z3000 (PSS, Port Richey, FL, USA). I valori di potenziale zeta (Z-pot) di ciascun campione sono stati determinati nell'intervallo di pH 3–11 e utilizzando NaCl come elettrolita (10 mM), seguendo la procedura riportata da Brunelli e collaboratori³⁰.

SEM-EDS

I materiali sono stati sospesi in EtOH (concentrazione finale di 0,1-0,5 mg / mL) attraverso soncatore a sonda. Circa 3 μ L della sospensione sono stati depositati su un substrato costituito da wafer di silicio ed essiccati a 60°C per 12 ore. Le immagini sono state raccolte in alto vuoto con lo strumento Zeiss Sigma VP Field Emission SEM, utilizzando un rilevatore in-lens con un'energia del fascio di 5,0 keV. La composizione elementare di un campione viene determinata usando lo spettro radiografico caratteristico del campione in esame. L'analisi EDS è stata eseguita in una modalità "spot" in cui il raggio (impostato a 10 keV) è localizzato su una singola area scelta manualmente nel campo visivo. La posizione è rappresentata nelle immagini SEM tramite l'impiego di un segno "+". I dati sono stati elaborati tramite Bruker Esprit 1.9.

4.5. Stabilità degli addotti: test di rilascio di Oxisol[®] dagli addotti

Per le particelle funzionalizzate ottenute con Oxisol[®], è stato effettuato un test di stabilità mediante il monitoraggio del rilascio del legante organico in un arco di tempo di 4,0 \pm 0,5h nelle seguenti condizioni: etanolo puro, etanolo ed acqua in miscela (2: 3) a pH 2.7, 6.1, 12, acqua pura a pH 2.7, 6.1, 12. Queste condizioni sono state scelte per prevedere il comportamento dell'addotto sulla pelle.

Il test è stato eseguito in un matraccio da 100 ml con 0,01 g di ZnO-Ox/TiO₂@Oxisol[®]. Dopo aver portato a volume con tre diversi media: etanolo, etanolo e miscela di acqua (2: 3) a pH 2.7, 6.1, 12.0 e acqua a pH 2.7, 6.1, 12.0, il sistema è stato posto sotto continua agitazione. Il test di lisciviazione è stato quindi monitorato spettrofotometricamente ad intervalli di tempo regolari (ogni 30 minuti per 4 ore); l'analisi è proseguita prelevando 0,5 ml di soluzione in seguito a centrifugazione e filtrazione a 0,45 micron, e collocandola in una cuvetta portata a volume di 3 ml con la miscela pura al pH considerato.

4.6. Stabilità degli addotti: test di rilascio di Oxisol[®] dalle emulsioni

Una quantità esattamente pesata di emulsione (circa 0,30 g) viene versata in un matraccio da 50 ml, portata a volume con soluzione fisiologica e lasciata sotto agitazione a 37°C per 4

ore. Passate le 4 ore, 10 ml di soluzione vengono raccolti e trasferiti quantitativamente in una provetta da centrifuga. La centrifugazione procede per 10 minuti a 6000 rpm, quindi viene eseguita la filtrazione. La soluzione pura viene successivamente analizzata spettrofotometricamente, prelevando 0,5 ml e diluendo a 3 ml direttamente in una cuvetta con acqua distillata.

4.7. Velocità sedimentazione

Per verificare la stabilità del sistema disperso, è stata utilizzata la centrifuga analitica multisample LUMiSizer® (L.U.M. GmbH, Berlino, Germania). Questa centrifuga è accoppiata con uno spettrometro NIR e impiega la tecnologia STEP™ (Space and Time-resolved Extinction Profiles). Il diverso comportamento dei singoli campioni può essere confrontato e analizzato in dettaglio tracciando la variazione di trasmissione in qualsiasi parte del campione o tracciando il movimento di qualsiasi limite di fase³¹.

Gli esperimenti sono stati condotti preparando i diversi campioni (tre replicati per ogni formulazione) nelle cuvette in policarbonato ad una concentrazione di 10 mg/l. La misurazione è stata eseguita con una velocità di 2000 rpm a 470 nm di lunghezza d'onda del laser; 600 numeri di profilo sono stati rilevati ogni 10 secondi.

4.8. Rilascio di Zn dai materiali a base di zinco (ZnO-Ox and Zn@Oxisol®)

La soluzione madre di ogni materiale a base di Zn è stata preparata mediante sonicazione per 5 minuti. Aliquote di queste sospensioni sono state diluite in 5 diversi solventi (soluzioni acquose a pH 3, 5, 7, 9, 12 e DMEM) ottenendo campioni con concentrazione iniziale di 10 mg L⁻¹. Queste sospensioni sono state agitate per mezzo di uno shaker da banco a 400 rpm e un'aliquota per ciascun tempo di analisi (0 ore, 6 ore, 24 ore e 48 ore) è stata raccolta in vials di PP e centrifugata a 18407 RCF per 40 minuti seguendo la procedura descritta da Wang et al.³². Quindi i surnatanti chiari sono stati accuratamente raccolti ed acidificati con acido nitrico al 2%, quindi analizzati tramite ICP-MS. L'analisi è stata ripetuta tre volte e il risultato finale è la media dei dati ottenuti.

4.9. Digestione: analisi ICP-MS

Il contenuto di Zn di ciascun materiale di base di zinco è stato misurato mediante ICP-MS (NexION 350D, Perkin Elmer), dopo una mineralizzazione acida a microonde mediante un forno Discover SP-D (CEM Corporation). Seguendo la metodica di Badetti e collaboratori³³, circa 20 mg di campioni secchi sono stati trattati con una miscela di H₂O₂ ultrapura e HNO₃ in rapporto 1: 2. Il programma di riscaldamento utilizzato per la digestione acida è stato il seguente: TMAX = 170°C, Ramp Time = 5 min, Hold Time = 2 min, Power = 300 W. Successivamente, i campioni sono stati raffreddati per 30 minuti a temperatura ambiente, opportunamente diluiti e analizzato da ICP-MS.

4.10. Fotocatalisi

L'attività fotocatalitica è stata eseguita monitorando la degradazione di Acid blue 9 dopo radiazione UV in miscela con ossido di metallo puro e ossido di metallo rivestito^{34 35 36}. Sono state studiate le condizioni di luce e buio al fine di rimuovere il contributo di adsorbimento del colorante sulla superficie dell'addotto e dell'ossido di metallo puro. 10 mg di materiale fotocatalitico sono stati aggiunti a due diverse soluzioni da 100 ml di Acid Blue 9 0,77 mM in EtOH (3 mg in 500 ml). La prima miscela è stata esposta alle radiazioni UV (360-400 nm), la seconda è stata mantenuta in condizioni di oscurità. Questo passaggio dura 1 ora, quindi il campione viene lasciato riposare per 3 ore. Prima di procedere con l'analisi UV-Vis (628 nm), i campioni sono stati centrifugati e filtrati con 0,45 µm.

4.11. Citotossicità

La citotossicità dei campioni basati su ZnO è stata misurata mediante Neutral Red Assay (NRU) su cellule 3T3. Il saggio NRU è stato eseguito in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) integrato con siero di vitello fetale al 10% (FCS), penicillina (100 U / mL), streptomicina (100 µg/mL) e glutammina (2 mM). Le cellule sono state seminate in triplicato in piastre da 96 pozzetti con una densità di $7 \cdot 10^3$ cellule/pozzetto e trattate per 48 ore con concentrazioni crescenti dei diversi composti (1 µg/ml, 10 µg/ml e 100µg/ml). Le cellule

non trattate sono state utilizzate come controllo negativo e sono state prese come riferimento del 100% della proliferazione cellulare.

4.12. Test Antiacne (Determinazione Minima Concentrazione Inibente – MIC – e Minima Concentrazione Battericida – MBC –)

Il ceppo utilizzato per quest'analisi è il *Propionibacterium acnes* ATCC (American Type Culture Collection) 6919 alla concentrazione di $2.7 \cdot 10^6$ cfu/ml

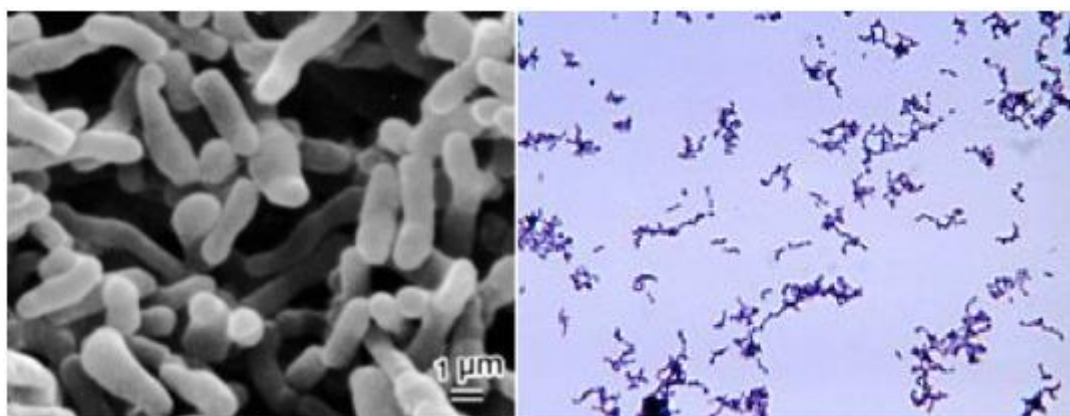


Figura 54. Propionibacterium acnes.

I terreni culturali impiegati sono il Tryptic Soy BROTH with 5% Sheep Blood (defibrinated) per la preparazione della sospensione batterica e per eseguire i test di sospensione, mentre Tryptic Soy Agar with 5% Sheep Blood (defibrinated) per eseguire i test in superficie (Diffusion Agar).

Condizioni di incubazione in anaerobiosi a 37°C: Anaerocult® è un sistema sicuro e collaudato per la cultura di microrganismi anaerobici e microaerofili. Il sistema Anaecult® è composto da sacchetti contenenti una miscela di reagenti che legano l'ossigeno e formano anidride carbonica.

Tempo di incubazione: 5 giorni.

La minima concentrazione inibente la crescita del microrganismo di prova, definita MIC, e la minima concentrazione batterica, definita MBC, sono valutate in piastre microtiter contenenti un inoculo microbico alla concentrazione di 10^6 pari a alla torbidità di 0.5 Mac

Farland, ottenuto da colture standard overnight di batteri in TSBroth with 5% Sheep Blood (defibrinated).

Il metodo di diffusione in agar o test di sensibilità (MIC) è un metodo quantitativo per valutare la sensibilità del ceppo microbico nei confronti di sostanze ad attività antimicrobica. Il potere antimicrobico è determinato in base al risultato dell'inibizione della crescita microbica (*Propionibacterium acnes*) sul terreno agarizzato. Si formano degli aloni di inibizione in base all'efficacia antimicrobica del prodotto in esame, che diffonde sulla superficie dell'agar precedentemente inoculato con sospensione batterica a titolo noto (Agar diffusion method). L'alone di inibizione è direttamente proporzionale al potere antimicrobico del prodotto nei confronti del microorganismo test (*Propionibacterium acnes*).

Dischi di nitrocellulosa (DN) di diametro di 1.0 cm sono messi a contatto con ogni prodotto di prova per 30 min, asciugati per 30 secondi e poi posti, sufficientemente distanziati tra loro, su piastre pronte di terreno di coltura agarizzato precedentemente seminate con la sospensione microbica test di *Propionibacterium acnes*.

È stato misurato, infine, il diametro dell'alone di inibizione dei batteri patogeni *Propionibacterium acnes*, dopo incubazione in anaerobiosi per 5 giorni a 37°C.

Il metodo in sospensione è un metodo quantitativo per valutare *in vitro* la sensibilità del ceppo microbico nei confronti di un prodotto ad attività antimicrobica, mediante valutazione del grado di turbidimetria della sospensione microbica. In seguito viene effettuata la valutazione del grado di sopravvivenza microbica mediante metodo della conta microbica totale in inclusione. Il prodotto in esame è stato suddiviso in pozzetti, che sono stati poi contaminati con la sospensione microbica di *Propionibacterium acnes* a titolo noto. Dopo il tempo di contatto è stato effettuato il metodo per inclusione in piastra TSA with 5% Sheep Blood (defibrinated), mediante incubazione, in condizioni di anaerobiosi, per verificare la sopravvivenza dei batteri *Propionibacterium acnes*.

Preparazione delle diluizioni della piastra microtiter

Nella piastra microtiter ogni pozzetto è stato preparato con il terreno di arricchimento BROTH with 5% Sheep Blood (defibrinated), solitamente 999 µl di terreno per pozzetto. In seguito 1 µl del campione di attività antimicrobica è stato inserito nel pozzetto. Le prove sono state ripetute in triplicato.

Inoculo

Una volta preparate le piastre microtiter, è stato aggiunto l'inoculo a titolo noto del microrganismo di prova: *Propionibacterium acnes*. L'inoculo è stato preparato utilizzando una coltura standard sviluppata a +37°C per 96h in anaerobiosi. La concentrazione microbica dell'inoculo è stata pari a 1 milione per millilitro (opacità corrispondente a 0.5 McFarland, ovvero $1.5 \cdot 10^6$ batteri).

Incubazione

Le piastre microtiter seminate sono state poste in incubazione in anaerobiosi per 5 giorni a +37°C, in modo da valutare la torbidità del pozzetto, come indice di sviluppo di colonie batteriche.

Interpretazione dei risultati

I risultati vengono definiti in base al grado di torbidità del pozzetto, che serve per calcolare il valore della MBC o concentrazione minima battericida.

Il pozzetto che presenta una maggiore torbidità corrisponde alla minore concentrazione del prodotto test con capacità antimicrobica in confronto al pozzetto di controllo senza crescita batterica.

La concentrazione minima battericida o MBC, è definita come la concentrazione più bassa del prodotto in esame in grado di determinare la riduzione microbica maggiore del 99.9% del microrganismo testato (metodo in sospensione o Dilution method).

Ogni pozzetto, corrispondente alla diluzione test, è successivamente analizzato mediante il metodo in inclusione in agar e posto in incubazione di anaerobiosi per 5 giorni a +37°C.

Ogni test è stato condotto in triplicato e la crescita dei batteri *Propionibacterium acnes* è stata controllata ogni giorno di incubazione in anaerobiosi fino al termine del tempo di incubazione.

4.13. Fotochemiluminescenza (PCL)

Il test PCL si basa sul metodo di Popov e Lewin³⁷ e misura l'attività antiossidante di un campione contro i radicali anionici superossido con lo spettrometro Photochem[®] (Analytik Jena, Lipsia, Germania). I radicali sono generati dal Luminol, un agente foto-sensibilizzante, in seguito ad esposizione alla luce UV (lampada al fosforo Double Bore[®], uscita 351 nm, 3

mWatt/cm²). La capacità antiossidante è stata misurata utilizzando il kit ACL (Antioxidant Capacity of Liposoluble substance) fornito dal produttore. La curva di emissione cinetica della luce, che non presenta alcuna fase di ritardo negli studi ACL, è stata monitorata per 180 secondi. Le aree sotto le curve sono state calcolate utilizzando il software di controllo e analisi PCL. La prima fase dell'analisi consiste nella misurazione del bianco e nella costruzione della curva di calibrazione mediante soluzioni con una concentrazione nota dello standard (Trolox[®]); la seconda fase prevede la misurazione della capacità antiossidante dei campioni. Per ogni campione le misurazioni sono state ripetute almeno tre volte. La capacità antiossidante è stata espressa in micromoli di Trolox[®] che forniscono una capacità antiossidante equivalente a un grammo del campione in esame.

4.14. SPF (Sun Protection Factor) in vitro

Metodica secondo Diffey-Robson

La valutazione del fattore di protezione solare con il metodo Diffey-Robson prevede l'utilizzo di un nastro chirurgico Leukofix BSN medical, sufficientemente trasparente alla luce UV-Vis e in grado di simulare la texture dell'epidermide umana. Per la determinazione della trasmittanza è stato utilizzato uno spettrofotometro UV-Vis Jasco V-700.

Per ciascuna determinazione viene preparato il campione tagliando il cerotto in modo tale da ricavare una superficie di dimensioni 5cm x 5cm; vi si applica il preparato solare alla dose di $2 \pm 0,04$ mg/cm² analogamente alla quantità applicata sulla pelle secondo il metodo COLIPA *in vivo*. Si pesano quindi alla bilancia analitica $50\text{mg} \pm 0,04$ mg/cm² di campione, distribuendoli in modo uniforme sul cerotto con l'indice preventivamente saturato con la stessa preparazione. Per la determinazione si effettua la correzione della linea di base ponendo due rettangoli di cerotto Leukofix BSN medical, sia sul raggio di riferimento che sul raggio campione dello strumento. Si prosegue poi rimuovendo il cerotto posto sulla finestra relativa al raggio campione. A questo punto, si posiziona il supporto caricato sulla finestra ottica dello spettrofotometro.

Il secondo step prevede invece l'acquisizione dei dati e la loro successiva elaborazione; in questo caso viene registrata la curva di assorbimento spettrale relativa alla regione UVA e UVB da 400 a 290 nm. La misurazione viene ripetuta almeno 10 volte variando opportunamente la posizione del cerotto rispetto alla radiazione spettrale incidente; in questo

modo si controlla l'omogeneità di distribuzione della preparazione sul supporto. Per ogni formulazione vengono preparati ed analizzati almeno 3 supporti in modo tale da garantire una discreta riproducibilità dei dati ottenuti. Al termine delle 10 acquisizioni, se ne mantengono almeno 6 tra quelle che permettono di ottenere una deviazione standard minima e attraverso il programma di elaborazione dati spettrali Spectra Analysis (Jasco Europe), si analizzano le curve sovrapponendo tra loro i 6 spettri relativi allo stesso cerotto. Si calcola quindi la media aritmetica delle sei osservazioni per ottenere uno spettro medio contenente i dati acquisiti nella regione spettrale di interesse. La curva spettrale media viene a questo punto salvata in modo tale da poter essere importata direttamente al programma di calcolo del SPF.

Il terzo step riguarda la determinazione del dato SPF: si utilizza un programma di calcolo sviluppato in ambiente Microsoft Excel che ci consente di trasformare i valori di assorbanza relativi all'intervallo 400-290 nm ed ottenuti ogni 0,5 nm, come curva di assorbanza media in valore di SPF, secondo l'equazione di Diffey e Robson. La valutazione del rapporto UVA/UVB (UVA ratio) diventa un importante parametro di analisi del rapporto tra l'assorbimento totale nell'UVA e quello nell'UVB (UVA/UVB) poiché si riferisce ai valori di assorbanza tra 290-320 e 320-400.

ISO24443-2012

La valutazione *in vitro* del valore di SPF è stata eseguita per via spettrofotometrica misurando l'assorbanza (calcolata dalla trasmittanza) con strumento SHIMADZU UV-2600 dotato di sfera di integrazione ISR 2600 60 mm accoppiato con un software di determinazione SPF. Il supporto è una piastra di polimetilmetacrilato (PMMA), 15 µL di glicerina sono impiegati come riferimento. Tale approccio *in vitro* prevede l'applicazione di un sottile film di prodotto su un substrato artificiale che deve essere il più simile possibile alla pelle umana per quanto riguarda le sue caratteristiche fisiche. Tramite misure spettrofotometriche, è possibile valutare la quantità di radiazione UV che passa attraverso il film. Il substrato utilizzato per questo studio (lastre di PMMA WW5, acquistate da Schonberg GmbH, Monaco, Germania) è stato scelto per la sua facilità di utilizzo, per la capacità di riprodurre la rugosità della pelle e per la riproducibilità con la quale tale rugosità può essere prodotta (5 µm). L'area della piastra è di 25 cm² ³⁸.

Inoltre, sono stati condotti studi di fotostabilità, come prescritto dalla procedura ISO 24443: 2012, con un dispositivo di simulazione solare (Suntest CPSp; Atlas, Linsengericht, Germania) dotato di una lampada allo xeno, un filtro ottico per tagliare lunghezze d'onda inferiori a 290 nm ed un filtro a blocchi IR per evitare effetti termici.

L'SPF *in vitro* è calcolato come segue dalle caratteristiche di assorbanza spettrale:

$$In\ vitro\ SPF = \frac{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda)I(\lambda)d(\lambda)}{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda)I(\lambda)10^{-A(\lambda)}d(\lambda)} \quad (4.1)$$

Dove $E(\lambda)$ è lo spettro d'azione dell'eritema (CIE-1987) a una lunghezza d'onda λ . $I(\lambda)$ l'irradianza spettrale ricevuta dalla sorgente UV a una lunghezza d'onda λ . $A(\lambda)$ un'assorbanza monocromatica dello strato del prodotto di prova alla lunghezza d'onda $d(\lambda)$ il passo della lunghezza d'onda (1 nm).

Il fattore di protezione UVA UVA-PF0 è stato calcolato individualmente per ciascuna piastra non irradiata:

$$UVAPF0 = \frac{\int_{\lambda=320nm}^{\lambda=400nm} P(\lambda)I(\lambda)d(\lambda)}{\int_{\lambda=320nm}^{\lambda=400nm} P(\lambda)I(\lambda)10^{-A(\lambda)C}d(\lambda)} \quad (4.2)$$

Con $P(\lambda)$ = spettro d'azione Persistent Pigment Darkening (PPD). $I(\lambda)$ = irradianza spettrale ricevuta dalla sorgente UV (UVA 320–400 nm per test PPD). $A(\lambda)$ = assorbanza monocromatica media dello strato del prodotto di prova. C = coefficiente di regolazione. $d(\lambda)$ = Passo della lunghezza d'onda (1 nm). La Lambda Critica descrive l'ampiezza della protezione su tutti gli spettri UV (280-400nm) ed è definita come la lunghezza d'onda alla quale si raggiunge il 90% dell'area sotto la curva di assorbanza (AUC) a partire da 290 nm. Il rapporto UVA/UVB è definito come il rapporto dell'assorbanza media da due intervalli di lunghezze d'onda (UVA 320-400nm e UVB 290-320nm). Questo valore, analogamente alla Lambda Critica, fornisce una valutazione dell'ampiezza della protezione nell'intera dello spettro UV: valori vicini a 1 sono indicativi di un'attività ad ampio spettro del filtro o prodotto.

4.15. Viscosità delle emulsioni

La viscosità delle emulsioni è stata calcolata tramite l'impiego di un viscosimetro Brookfield DV2T con spindle 25 e sample adapter termostato a $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$; il valore è stato determinato a 30 secondi. Ogni analisi è stata ripetuta almeno tre volte.

4.16. Densità delle emulsioni

Per la determinazione della densità ci si è avvalsi di un densimetro Easy D30 Mettler-Toledo. Il campione è stato caricato e portato a temperatura costante di $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, quindi misurato il valore di densità. Ogni analisi è stata ripetuta almeno tre volte.

4.17. Valutazione statistica

Il confronto delle analisi viene effettuato considerando il p value che rappresenta la probabilità di trovare i risultati osservati, o più estremi, quando l'ipotesi nulla (H_0) viene supposta vera. La scelta del livello di significatività a cui viene rifiutato H_0 è arbitraria. Convenzionalmente sono stati usati i livelli del 5% (meno di 1 su 20 possibilità di sbagliare), 1% e 0,1% ($p < 0,05$, 0,01 e 0,001). La maggior parte degli autori parla di valore statisticamente significativo quando $p < 0,05$ e statisticamente altamente significativo quando $p < 0,001$ (meno di una possibilità su mille di sbagliarsi).

L'affinità dei gruppi carbossilici e catecolici con il biossido di titanio è riportata in letteratura, in particolare Lukas et al.²⁷ hanno condotto uno studio sistematico al fine di confrontare la funzionalizzazione di diverse molecole contenenti anche funzionalità carbossiliche e catecoliche da un punto di vista cinetico e termodinamico. Wei Lin et al.³⁹ hanno invece studiato l'adsorbimento termodinamico del 3,4-diidrossibenzoato sulla superficie colloidale dell'ossido di zinco. Questo studio, in particolare, è stato preso come riferimento per formulare un'ipotesi sul coordinamento di Oxisol®.

Questi studi, insieme ai risultati della spettroscopia IR, suggeriscono un'efficace aggiunta tramite duplice via dell'Oxisol® al TiO₂, anche se, probabilmente, con una prevalenza di coordinazione del gruppo catecolico²⁷ (**Figura 56**).

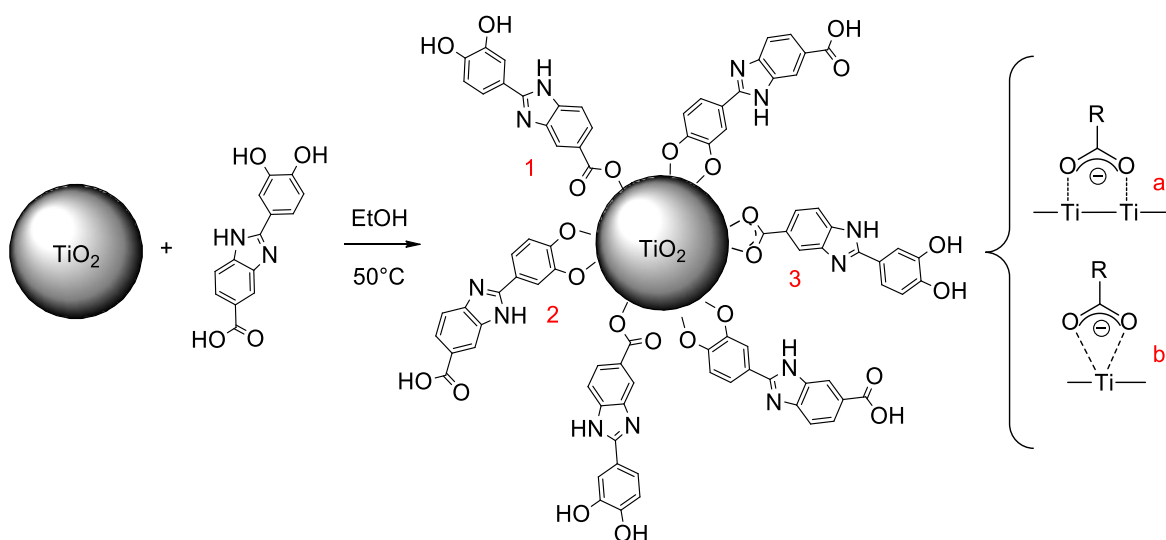


Figura 56. Vie di addizione di Oxisol® alle particelle di TiO₂. Come dimostrato dall'analisi FT-IR, le opzioni 1 e 2 sono le più prevedibili (in particolare la più frequente sembrerebbe l'opzione 2), comunque l'opzione 3 può anche avvenire tramite ponte (a) o chelazione (b) in aggiunta al titanio.

Analisi termogravimetrica (TGA)

Al fine di comprendere la quantità di stechiometria del processo, è stata effettuata una rilevazione indiretta e diretta del legante. La rilevazione indiretta ha consistito nel monitoraggio continuo della riduzione della concentrazione di Oxisol® nella miscela di reazione; la presenza del plateau corrisponde ad una saturazione dei siti disponibili sulle particelle di TiO₂ e quindi ad una completa funzionalizzazione. La quantificazione diretta dell'Oxisol® aggiunto, invece, è stata rilevata tramite analisi TGA. In **Tabella 16** sono riportati i valori TGA ottenuti.

	Perdita di peso (%)
n-TiO₂@Oxisol®	10.6±0.6
TiO₂@Oxisol®	5.8±0.3

Tabella 16. Funzionalizzazione percentuale del biossido di titanio rilevata con il metodo TGA. Per ciascun metodo l'analisi è stata eseguita tre volte.

Caratterizzazione colloidale (CSA, DLS-ELS, ζ)

Una delle cause dell'instabilità dei sistemi dispersi (sospensioni, emulsioni) è dovuta all'azione della gravità, che tende a separare le fasi che compongono il sistema.

Un tasso di sedimentazione più basso delle particelle indica una maggiore stabilità e di conseguenza una miglior prestazione del prodotto nel tempo. In **Tabella 17** è mostrata la correlazione tra velocità di sedimentazione e dimensione delle particelle rilevate da DSC e CSA.

	DLS (nm) ± SD	CSA (nm) ± SD	Velocità di sedimentazione (µm/s) ± SD
Non nanometric TiO₂	343±18	523.9±16	251.3±9
TiO₂@Oxisol®	324±16	328.9±5	80.0±1
Nanometric TiO₂	135±7	187.5±3	26.4±2
n-TiO₂@Oxisol®	111±6	166.2±9	20.6±0.2

Tabella 17. Valori della dimensione delle particelle rilevati tramite DLS e CSA (prima e seconda colonna) e velocità di sedimentazione (ultima colonna).

Le tecniche CSA e DLS mostrano risultati comparabili per quanto riguarda le dimensioni delle particelle con dimensioni generalmente più contenute per quanto riguarda il TiO₂ rivestito, probabilmente a causa della miglior dispersione. Anche la velocità di sedimentazione risulta migliore nel caso del biossido di titanio rivestito. Per capire se il contributo alla stabilità è dato dalla repulsione sterica o elettrostatica, è stata effettuata un'analisi del potenziale Z (**Figura 57**). Il potenziale Z è un parametro legato alla densità superficiale della carica, ai fenomeni di attrazione o repulsione in soluzione, e quindi alla stabilità degli aggregati. Se il valore di potenziale zeta è elevato, la repulsione elettrostatica impedisce l'aggregazione delle particelle disperse; mentre quando è basso prevalgono le forze attrattive e le specie danno origine a fenomeni di coagulazione

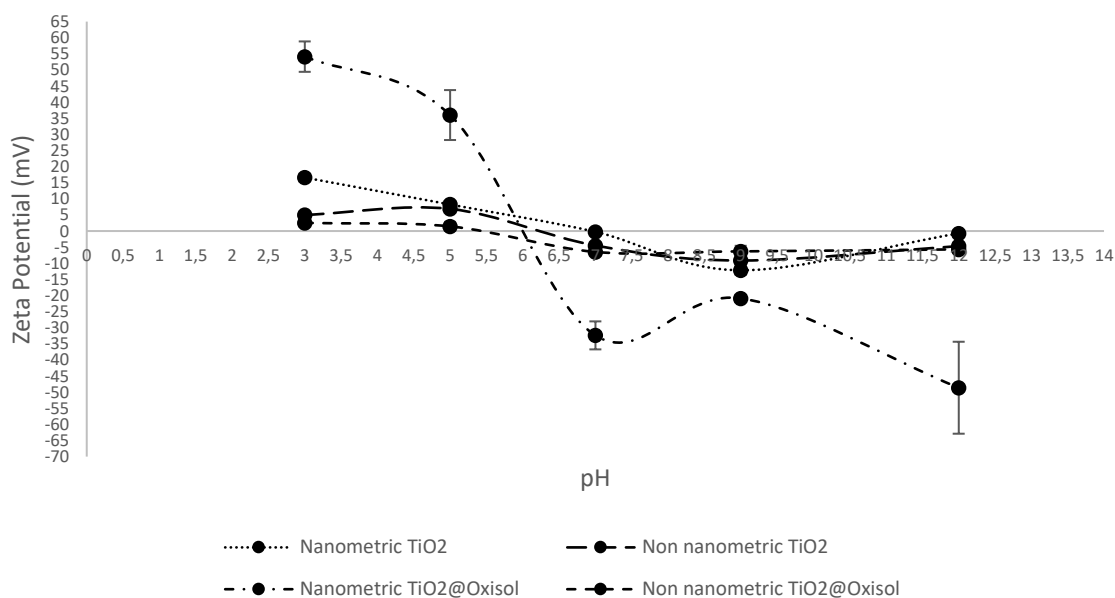


Figura 57. Valori di potenziale Z delle particelle in esame.

Il valore di 30 mV è stato raggiunto solo per il TiO₂ nanometrico funzionalizzato (TiO₂@Oxisol[®]) che mostra solo un lieve aumento della stabilità rispetto alla sua forma non rivestita (**Tabella 17**). Queste evidenze ci suggeriscono che l'aumento della stabilità è dovuta principalmente alla repulsione sterica.

SPF *in vitro*

Le emulsioni contenenti TiO₂@Oxisol[®] nanometrico e non nanometrico, TiO₂ soli e le miscele TiO₂ + Oxisol[®] sono state analizzate *in vitro* al fine di ottenere un profilo di capacità filtrante di ciascuno.

I risultati più interessanti sono stati ottenuti facendo il confronto tra la semplice miscela (TiO₂ + Oxisol[®]) e TiO₂ funzionalizzato (n-TiO₂ @ Oxisol[®] e TiO₂ @ Oxisol[®]). I dati hanno mostrato un aumento di SPF in entrambe le specie rivestite di TiO₂ (nanometriche e non nanometriche) rispetto a TiO₂ + Oxisol[®]. L'aumento è stato maggiore per le dimensioni nanometriche (con un aumento del 73%) e inferiore per le dimensioni non nanometriche (19%).

Inoltre, i valori UVA-PF sono risultati migliori per la funzionalizzazione, solo il rapporto UVA/UVB e il valore di lambda critica non hanno mostrato un comportamento migliore, tuttavia i valori medi di ossido di metallo funzionalizzati sono uguali per ogni condizione (miscela e funzionalizzazione).

La tabella seguente (**Tabella 18**) esprime efficacemente quanto detto.

Filtro	SPF	UVA-PF	Critic λ	Cov	UVA/UVB
TiO₂	4.17	2.65	375	2.72%	0.86
TiO₂+Oxisol[®]	1.95	1.785	385	3.13%	0.98
TiO₂@Oxisol[®]	2.47	2.29	387	1.02%	0.99
n-TiO₂	2.94	3.62	384	1.04%	0.95
n-TiO₂+Oxisol[®]	2.33	1.87	382	2.46%	0.91
n-TiO₂@Oxisol[®]	2.27	2.14	387	2.00%	0.99

Tabella 18. Funzionalizzazione percentuale ed aumento del valore di SPF rispetto alla semplice miscela.

La spiegazione potrebbe essere che funzionalizzazione porti ad una riduzione dell'energia dei fotoni necessaria per trasferire un elettrone nella banda di conduzione, facilitando così l'assorbimento della luce visibile, come nel caso delle DSSC (Dye Sensitized Solar Cell)⁴⁰. Pertanto, una diminuzione del band gap potrebbe condurre, oltre ad un aumento dell'SPF, una diminuzione dell'effetto fotocatalitico, con un consistente beneficio per la salute umana.

Fotochemoluminescenza (PCL)

Al fine di valutare l'influenza della funzionalizzazione in termini di capacità antiossidante, le emulsioni contenenti il principio attivo tal quale, in una miscela o funzionalizzate, sono state testate mediante fotochemiluminescenza (PCL). I risultati del test condotti sull'attività antiossidante sono mostrati in **Tabella 19**.

Formulazione	μmol TE/grammo
Emulsione con Oxisol [®] 0,5%	41.96 \pm 2.1
Emulsione con miscela (TiO ₂ +Oxisol [®])	10.37 \pm 0.3
Emulsione con miscela (n-TiO ₂ +Oxisol [®])	1.96 \pm 0.02
Emulsione con addotto TiO ₂ @Oxisol [®]	11.91 \pm 0.1
Emulsione con addotto n-TiO ₂ @Oxisol [®]	53.70 \pm 3.7

Tabella 19. Risultati PCL eseguiti sulle emulsioni contenenti TiO₂. Ogni valore è stato ottenuto da tre diversi esperimenti (media \pm SE).

Un lieve aumento è stato osservato per TiO₂ non nanometrico ($p \leq 0.05$), mentre è stato osservato un evidente e significativo aumento del potere antiossidante per TiO₂ nanometrico ($p \leq 0.001$).

Un certo potere antiossidante è stato osservato per tutte le miscele e gli addotti con risultati decisamente interessanti per il TiO₂ nanometrico e comunque positivi per TiO₂ non nanometrico (valore $p < 0,05$). Un effetto antiossidante più elevato è stato generalmente

osservato nell'ossido di metallo funzionalizzato anziché nella miscela, ciò potrebbe dipendere da diversi fattori. Il primo motivo potrebbe essere un'azione conservativa di Oxisol[®] che è stata preservata grazie alla funzionalizzazione, quindi la piccola quantità di Oxisol[®] attivo rilasciata in emulsione determina tale l'attività antiossidante. Un altro motivo potrebbe risiedere nella riduzione del potenziale di ossidazione del TiO₂⁴¹ data dalla funzionalizzazione.

Test di rilascio *in vitro*

Il rilascio di Oxisol[®] è stato determinato al fine di comprendere il comportamento dell'addotto sia nell'emulsione sia quando questi verrà applicato sulla pelle. In principio è stato valutato il rilascio dalle sole particelle (non in emulsione) ed i risultati vengono di seguito riportati:

Substrato	Solvente	pH	Tempo [h]	Oxisol [®] Depositato (%)
Nanometric TiO ₂	CH ₃ CH ₂ OH/H ₂ O	12.0	4.0±0.5	61.43±6.76
		6.1		9.77±1.95
		2.7		11.05±2.21
	CH ₃ CH ₂ OH	-		9.71±2.01
	H ₂ O	12.0		1.73±0.31
		6.1		<1.0
		2.7		<1.0
		Non nanometric TiO ₂		CH ₃ CH ₂ OH/H ₂ O
6.1	5.01±1.87			
2.7	4.13±1.03			
CH ₃ CH ₂ OH	-		9.54±0.922	
H ₂ O	12.0		7.01±2.01	
	6.1	<1.0		
		2.7	<1.0	

Tabella 20. Rilascio dell'Oxisol[®] dagli addotti di TiO₂ in differenti solventi.

Per il solvente inorganico (acqua) è stato mostrato un rilascio di Oxisol[®] più elevato in condizioni alcaline (**Tabella 20**). Tuttavia, l'ambiente organico e organico/inorganico sembrerebbero le condizioni più critiche per la stabilità dell'addotto con una percentuale di rilascio più elevata. La forma nanometrica mostra una maggiore perdita (61%) quando questi

è nella miscela etanolo/acqua a pH 12.00, oppure in etanolo puro. La stessa tendenza (maggiore rilascio in condizioni alcaline) è stata confermata per la forma nanometrica.

Sono state condotte ulteriori analisi per valutare il rilascio dalle emulsioni. I risultati sono mostrati in **Tabella 21**:

Substrate	Solvente	Tempo [h]	Oxisol [®] rilasciato (%)
n-TiO ₂ @Oxisol [®]	H ₂ O 0.90% NaCl	4.0±0.5	4.36±0.22
TiO ₂ @Oxisol [®]	H ₂ O 0.90% NaCl	4.0±0.5	4.31±0.25

Tabella 21. Percentuale di Oxisol[®] rilasciata da emulsioni. Le percentuali sono riferite all' Oxisol[®] funzionalizzante il TiO₂.

Questi dati sono stati confrontati con l'ambiente organico / inorganico nella **Tabella 20**, infatti l'emulsione potrebbe essere assimilata a una miscela di fasi organiche e inorganiche. In accordo con i risultati ottenuti nella **Tabella 21**, i valori dovrebbero apparire molto simili per la versione non nanometrica, piuttosto bassi per la versione nanometrica. La diminuzione della perdita per la versione nanometrica passando all'applicazione in emulsione (dal 9% al 4%) potrebbe essere ricondotta ad una maggiore stabilizzazione dell'addotto in emulsione, forse data dal metodo di preparazione nel quale il prodotto funzionalizzato viene predisposto in fase oleosa e solo successivamente aggiunto in fase acquosa. La dispersione più efficiente dell'addotto nanometrico (n-TiO₂ @ Oxisol[®]) anziché del suo corrispettivo non nanometrico (TiO₂ @ Oxisol[®]) nella fase oleosa (intuibile dall'analisi del potenziale Z) potrebbe spiegare questo fenomeno.

Fotocatalisi

Come riportato da Dimitrovska et al.³⁸, l'attività fotocatalitica è uno dei motivi principali della formazione di ROS mediate dal filtro fisico. Per capire se il rivestimento porta a una riduzione dell'attività fotocatalitica, è stato eseguito un test misurante tale attività tramite la determinazione della fotodegradazione del colorante Blu Acido 9. La tabella seguente mostra i risultati (**Tabella 22**)

	Concentrazione [μM]	
Soluzione di Acido Blu 9 (Dark)	109.99 \pm 23.59	
Soluzione di Acido Blu 9 (UV)	86.50 \pm 18.86	
	Colorante [μM] (n-TiO ₂)	Colorante [μM] (TiO ₂)
TiO₂@Oxisol[®] (Dark)	59.64 \pm 13.51	76.31 \pm 16.87
TiO₂@Oxisol[®] (UV)	47.08 \pm 11.03	57.80 \pm 13.14
TiO₂ (Dark)	41.74 \pm 9.91	43.68 \pm 10.28
TiO₂ (UV)	2.70 \pm 2.08	2.18 \pm 1.95

Tabella 22. Attività di fotocatalisi misurata per le varie soluzioni. I valori sono riportati come concentrazione di colorante [μM] dopo il trattamento.

La **Tabella 22** mostra una fotosensibilizzazione non significativa del colorante tal quale ed un'efficace riduzione dell'attività fotocatalitica del TiO₂ quando questi è funzionalizzato. Il medesimo test è stato riproposto in condizione di oscurità ed ha rivelato che il contributo alla diminuzione del colorante imputabile all'adsorbimento sulla superficie delle particelle è trascurabile. Inoltre, è stato confermato che la riduzione dell'attività fotocatalitica non è causata da una minore concentrazione di TiO₂ in peso nelle specie rivestite; infatti, se ciò dovesse essere vero, dovrebbe essere rilevato un calo solo dell'11% (specie nanometrica) e del 6% (specie non nanometrica), considerando la quantità di funzionalizzazione mostrata in **Tabella 16**. Il motivo per cui l'effetto fotocatalitico è stato ridotto dalla funzionalizzazione potrebbe dipendere sia dall'ingombro sterico generato dal legante (**Figura 58.a**), sia dall'iniezione diretta dell'elettrone sulla banda di conduzione da parte del limitatore organico (**Figura 58.b**)⁴¹. Le radiazioni impiegate nell'esperimento, infatti, si verificano nella regione UVA (320-400nm) e l'energia è sufficiente per eccitare l'elettrone nella molecola organica ma solo in minor modo l'elettrone nella banda di valenza (300nm). Ciò ha portato ad un sensibile abbassamento dell'attività ossidativa svolta dall'h⁺ nella banda di valenza, preservando solo l'attività della banda di conduzione (**Tabella 57**).

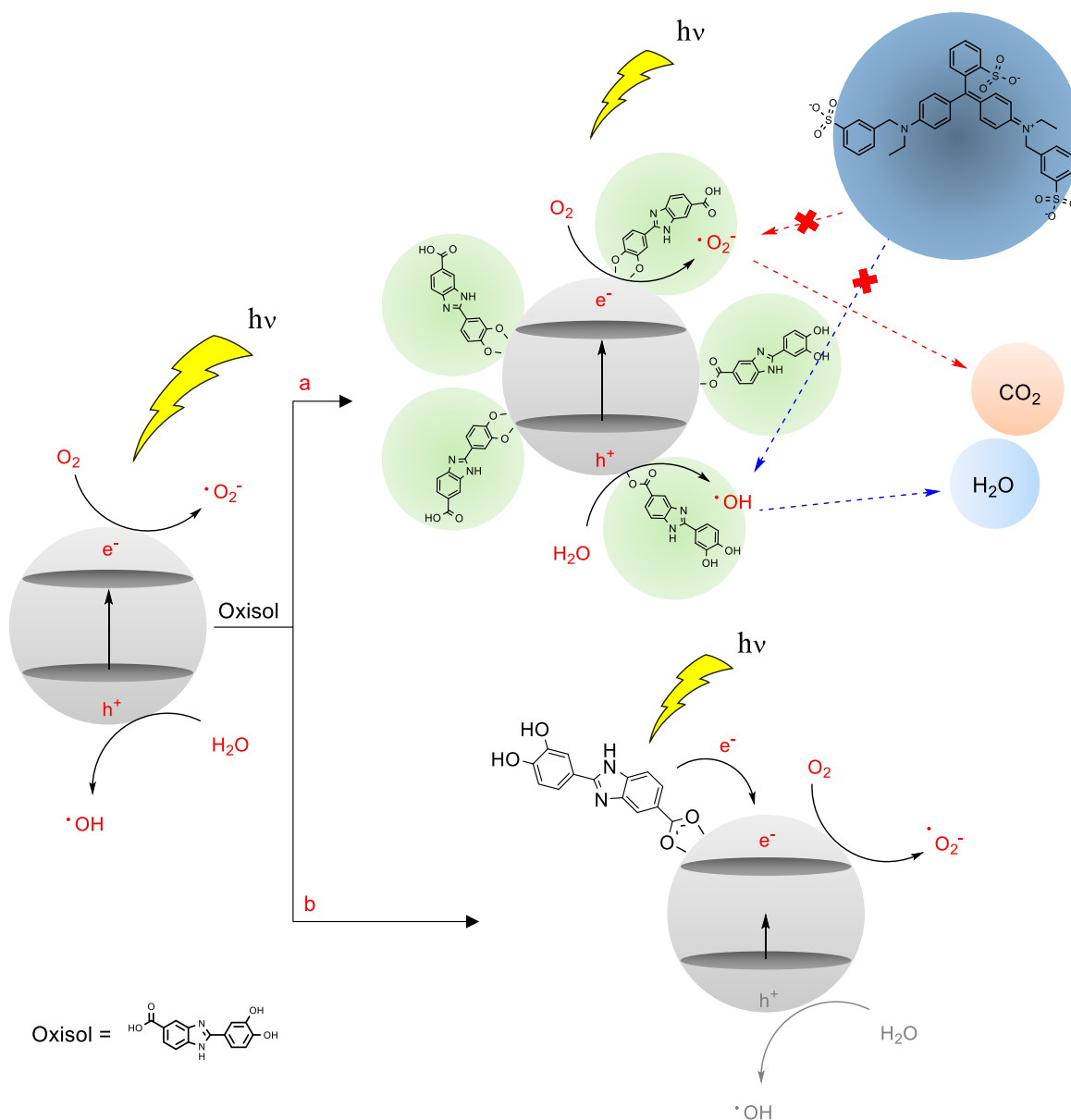


Figura 58. Possibile meccanismo di abbattimento della fotocatalisi. a) l'ingombro sterico impedisce l'avvicinamento della molecola di colorante alla superficie del TiO₂. b) dopo la radiazione UV il ligando inietta direttamente l'elettrone nella banda di conduzione. Questo impedisce la formazione di hole nella banda di valenza, diminuendone pertanto l'attività ossidativa.

Citotossicità

La crescita cellulare, in risposta all'aumento delle concentrazioni (da 10 a 100 µg/ml) dei diversi composti presenti nei terreni di coltura, è stata valutata su cellule 3T3 coltivate per 48 ore. Come mostrato in **Tabella 23**, i composti di TiO₂ non hanno mostrato effetti citotossici, anche alle massime concentrazioni utilizzate.

Campione	Concentrazione $\mu\text{g/ml}$	% Inibizione \pm SD
Controllo	0	0.00 \pm 0.00
n-TiO₂	1	-2.73 \pm 1.78
	10	-7.50 \pm 1.04
	100	3.08 \pm 5.24
n-TiO₂@Oxisol[®]	1	-1.37 \pm 4.27
	10	0.18 \pm 4.80
	100	4.17 \pm 6.20
TiO₂	1	-1.75 \pm 1.77
	10	-0.84 \pm 1.97
	100	0.30 \pm 6.02
TiO₂@Oxisol[®]	1	-4.40 \pm 3.03
	10	0.51 \pm 8.58
	100	6.34 \pm 5.94

Tabella 23. Inibizione della crescita cellulare dei campioni testati a concentrazioni differenti: 100 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$.

5.2. ZnO - Oxisol®

Caratterizzazione via FT-IR

L'indagine qualitativa dei prodotti ottenuti è stata eseguita mediante spettroscopia IR facendo un confronto tra ZnO puro, Oxisol® puro, ZnO ed Oxisol® in miscela, Oxisol® funzionalizzato (ZnO-Ox) (**Figura 59**).

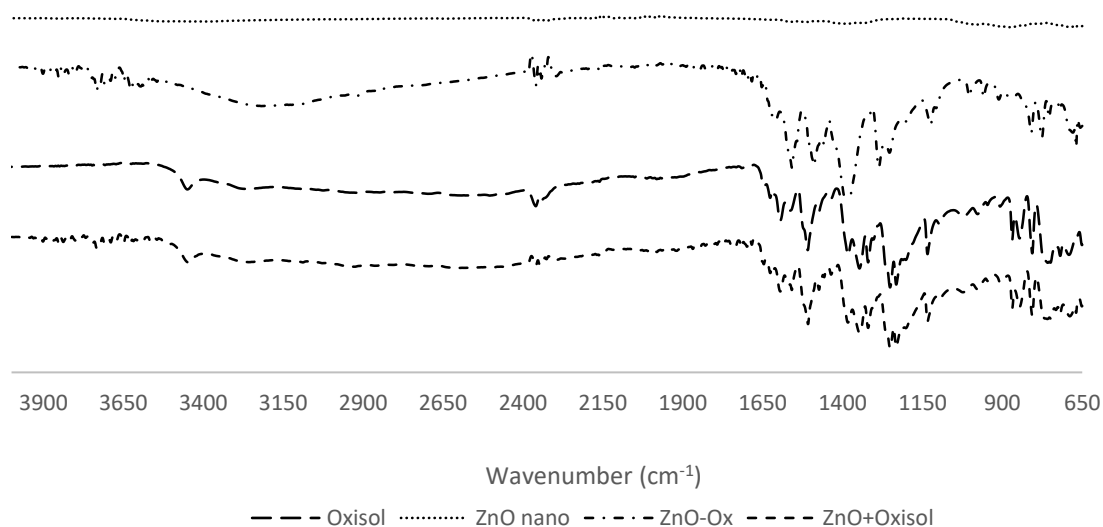


Figura 59. Confronto tra spettri FT-IR di ZnO (ZnO nano), miscela ZnO/Oxisol® (ZnO + Oxisol®), funzionalizzato (ZnO-Ox), Oxisol® (Oxisol®).

La chiara differenza tra gli spettri dell'Oxisol® e della miscela con ZnO, rispetto agli spettri dell'addotto (ZnO-Ox) rappresenta una prima conferma dell'aggiunta di ossido di zinco (**Figura 59**). Nel dettaglio si può notare la scomparsa del picco relativo al ν (C = O) riferito all'acido carbossilico puro, visibile chiaramente a 1700 cm⁻¹ nello spettro della miscela, ZnO + Oxisol. Lo splitting di questo picco in stretching antisimmetrici, ν_{as} (COO⁻), e simmetrici ν_s (COO⁻) a frequenze d'onda minori (1400-1500 cm⁻¹) è caratteristica del gruppo carbossilico coordinato con il metallo⁴². Queste variazioni possono essere assunte come diagnostiche della formazione del legame tra zinco e Oxisol®.

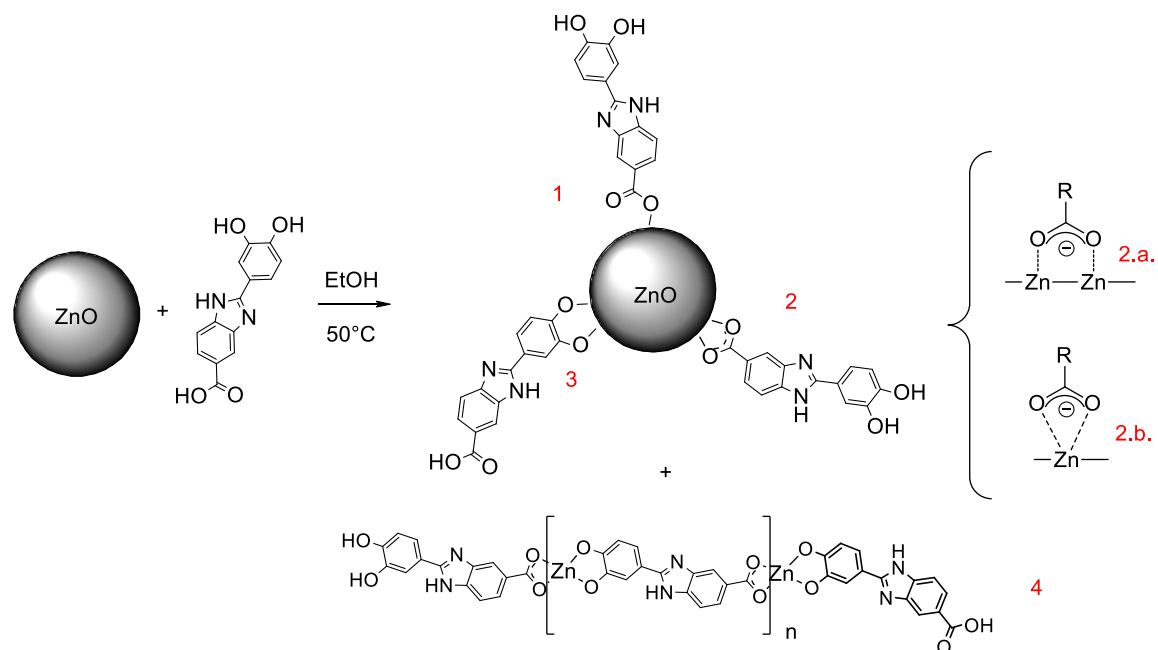


Figura 60. Possibili meccanismi di addizione di Oxisol® a ZnO. L'aggiunta tramite il gruppo carbossilico sembrerebbe la più favorita, sia attraverso il ponte (2.a.) che tramite chelazione (2.b.). Ad ogni modo possono esserci coordinazioni allo ZnO tramite ossidrilie carbossilico (1) e catecolo (3), sebbene con minore frequenza. Lo studio sulla stechiometria riportato nel prossimo paragrafo suggerisce la possibilità di una struttura polimerica complessa.

Analisi termogravimetrica (TGA) ed ICP-MS

Gli addotti sono stati sottoposti ad analisi termogravimetrica, la quale ha mostrato una notevole frazione organica (**Tabella 24, righe 2 e 3**), ben superiore a quanto aspettato dai dati riscontrati in letteratura per leganti simili sulla superficie di TiO₂, che difficilmente superano il 10% in peso²⁷. Inoltre tale funzionalizzazione risulta essere superiore nel micrometrico, in controtendenza con quanto prevedibile. Tali evidenze hanno condotto ad ipotizzare la formazione di specie differenti dal semplice coating, come ad esempio un complesso Zn-Oxisol®. Per questa ragione è stato sintetizzato un complesso a partire da ZnCl₂ ed è stata eseguita un'analisi TGA/DSC anche su quest'ultimo (**Tabella 24, riga 4**). Le analisi TGA sono mostrate in **Figura 61, panel A**.

	Perdita di peso (%)
Nanometric ZnO-Ox	21.08±0.8
Non-nanometric ZnO-Ox	42.26±1.1
Zn-Complex	78.67±0.1

Tabella 24. Valori TGA ottenuti. Per ogni substrato l'analisi è stata ripetuta tre volte.

Come anticipato, i dati ottenuti mostrano una elevata presenza di frazione organica in tutte le specie rivestite. La presenza di due picchi entalpici nell'analisi DSC è un primo indizio di una duplice natura dell'addotto, presumibilmente una coesistenza tra coating e

complessazione. La forte somiglianza tra i profili DSC (**Figura 61, panel B**) delle specie ZnO-Ox micrometrico e Zn-Complex rappresenta una prima indicazione a supporto della duplice natura dell'addotto. Inoltre, dai dati ottenuti dalla TGA, è stato possibile formulare un'ipotesi sulla struttura del complesso. Essendo infatti il rapporto stechiometrico di Zn ed Oxisol molto prossimo ad 1:1 e lo Zn^{2+} in grado di fornire complessi tetraedrici⁴³, è lecito presupporre che una parte dell'addotto non sia altro che una struttura polimerica (**Figura 60.4**) dove gli ioni Zn^{2+} sono coordinati di volta in volta dal gruppo catecolico e carbossilico dell'Oxisol[®].

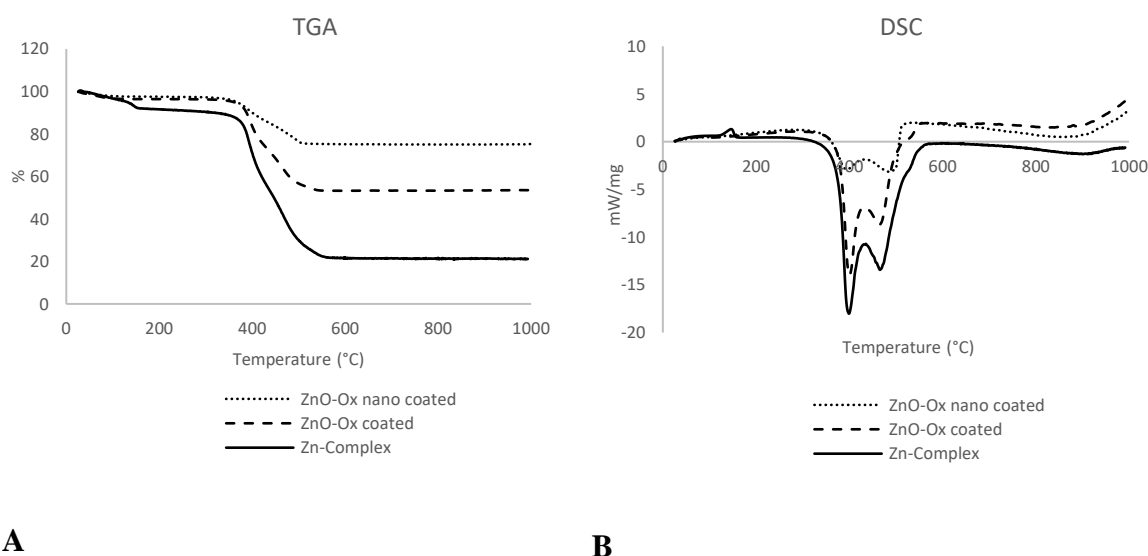


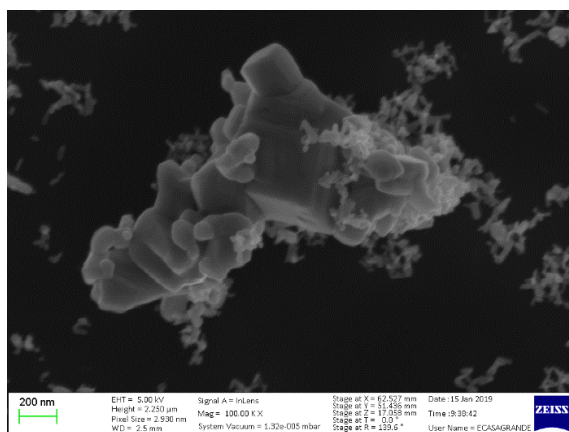
Figura 61. Analisi TGA (A) e DSC (B) per particelle rivestite nanometriche, non nanometriche ZnO (ZnO-Ox) e per il complesso. I due diversi picchi di DSC potrebbero essere ricondotti ad un diverso tipo di legame (funzionalizzazione e complessazione)

Una ulteriore conferma alla grande quantità di frazione organica presente nel materiale è fornita dall'analisi all'ICP-MS che fornisce dati comparabili con quelli ottenuti alla TGA (**Tabella 25**).

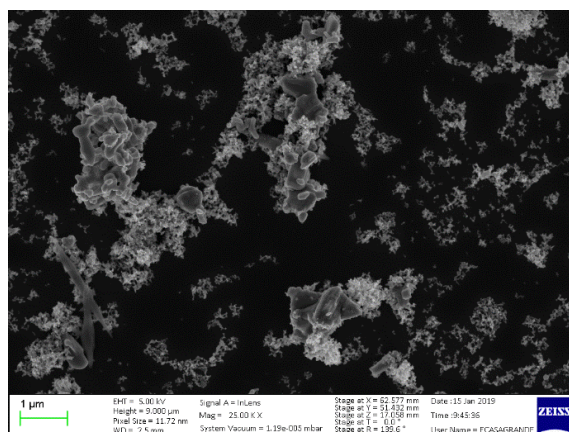
	Frazione organica (%)
Nanometric ZnO-Ox	26.44±1.3
Non-nanometric ZnO-Ox	38.16±2.3
Zn-Complex	77.69±1.4

Tabella 25. Frazione organica (percentuale in peso) dedotta dall'analisi ICP

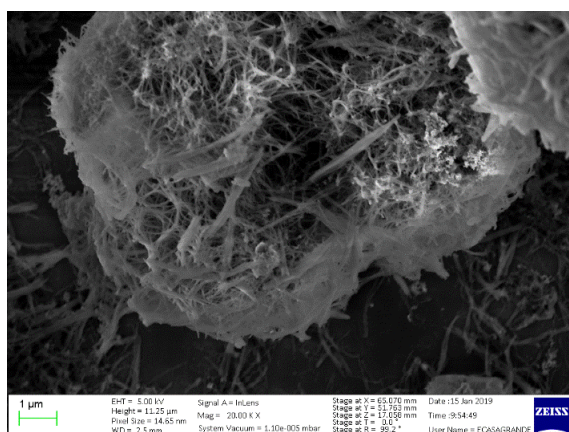
Questi risultati sottolineano come, non solo la percentuale decisamente elevata di legante organico, ma anche la sua maggior presenza sul materiale non nanometrico necessitino di maggiori approfondimenti. È stata pertanto effettuata un'analisi SEM dei campioni non nanometrici (**Figura 62**).



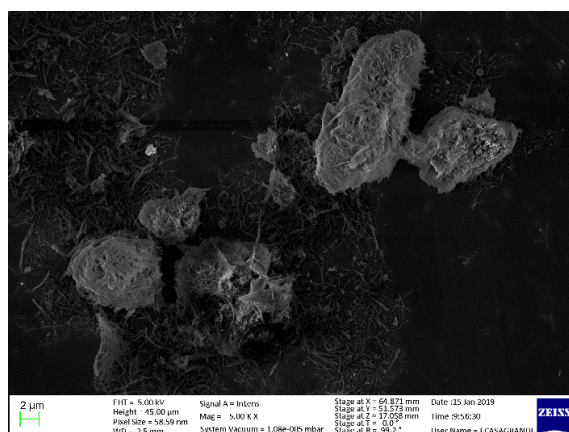
A



B



C



D

Figura 62. Immagine SEM dello ZnO non nanometrico puro (A e B) e della sua forma funzionalizzata (C e D).

La **Figura 62** mostra lo ZnO non nanometrico non rivestito (A e B) e lo ZnO rivestito (C e D). Nei pannelli A e B è osservabile la struttura caratteristica dello ZnO oltre ad una certa eterogeneità della grandezza delle particelle. I pannelli C e D, invece, mostrano strutture agglomerate alternate ad altre aghiformi che lasciano ipotizzare una duplice natura del materiale ottenuto. Al fine di confermare questa ipotesi, un'analisi SEM-EDX è stata eseguita misurando i differenti rapporti Zn/O tra struttura "bulk" ed aghiforme (**Figura 63**).

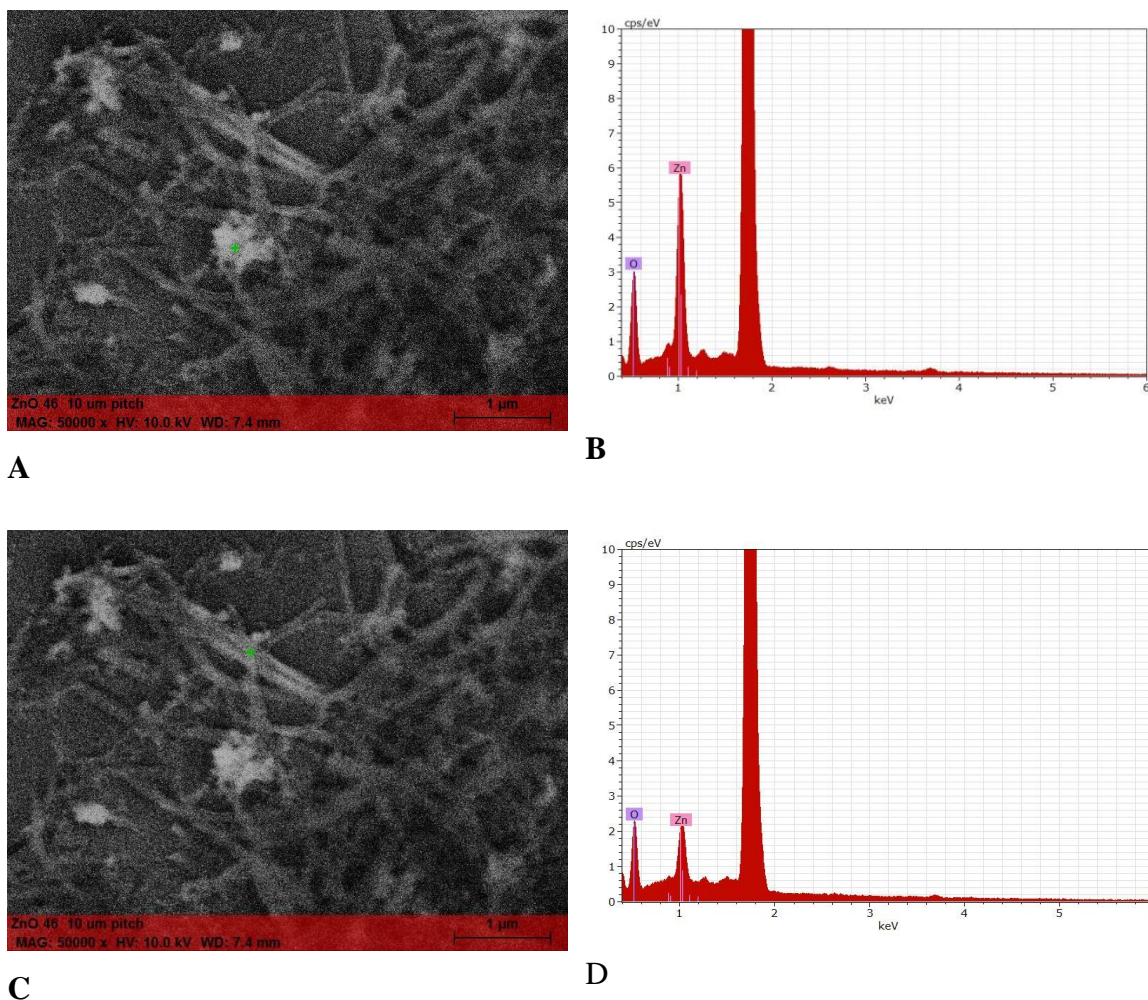


Figura 63. La croce verde nel pannello A mostra il punto in cui è stata eseguita l'analisi EDX (riportata nel pannello B). A e B sono riferite alla particella agglomerata o bulk. I pannelli C e D, invece, sono le analisi riferite alla particella aghiforme.

Con riferimento alla **Figura 63**, la croce verde indica il punto preciso analizzato. I pannelli A e B sono riferiti alla struttura agglomerata, mentre quelli C e D alla struttura aghiforme. Lo spettro in rosso riporta le abbondanze relative di zinco ed ossigeno. La differenza tra gli spettri riportati ci dà una conferma della diversa natura del prodotto in cui la frazione aghiforme presenta una maggiore quantità di ligando organico.

Ulteriore conferma di una struttura diversa da una semplice funzionalizzazione è stata data dall'analisi ATR-FTIR (**Figura 64**). In effetti, è stata eseguita un'analisi di confronto tra il complesso ottenuto mediante reazione tra ZnCl_2 e Oxisol[®] ed il materiale Zn-Ox confermando una elevata somiglianza (95%) tra le due specie. La presenza del picco caratteristico di ZnO a 500 cm^{-1} conferma la presenza sia di rivestimento che di complessazione.

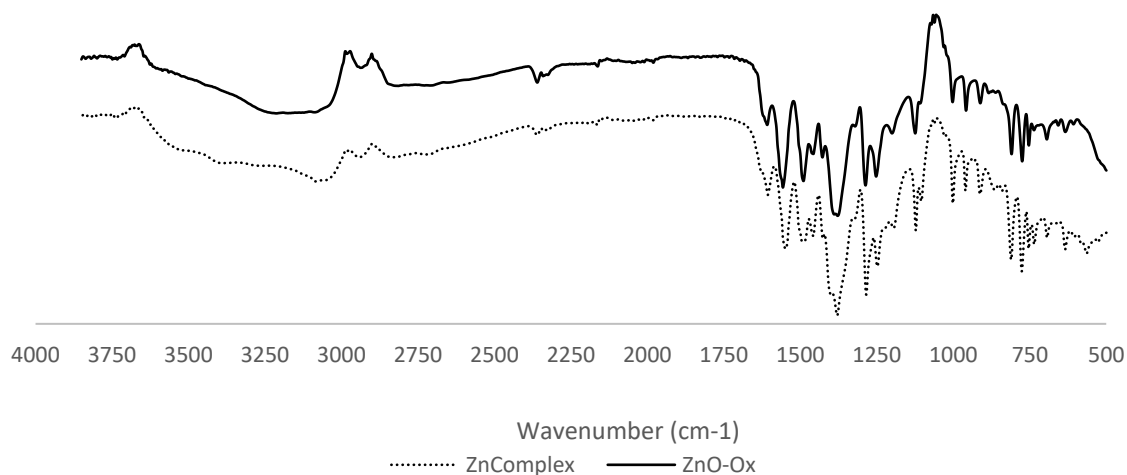


Figura 64. Confronto tra lo spettro del complesso e l'addotto. I risultati mostrano una somiglianza tra i due del 95% nella regione tra 1700 e 650 cm^{-1} , l'unica differenza è rappresentata dal segnale caratteristico dello ZnO vicino a 500 cm^{-1} che conferma la coesistenza di coating e complessazione nell'addotto.

Ciò fornisce un'ulteriore prova della formazione del complesso oltre al semplice coating dello ZnO. Il meccanismo potrebbe basarsi su una solubilizzazione e ricristallizzazione dello ZnO a causa della reazione con Oxisol[®]. Questo fenomeno (che potrebbe spiegare efficacemente i valori di TGA) può verificarsi attraverso due diversi meccanismi: ligand promoted solution oppure equilibrium shift dovuto alla complessazione degli ioni in soluzione⁴⁴ (**Figura 65**).

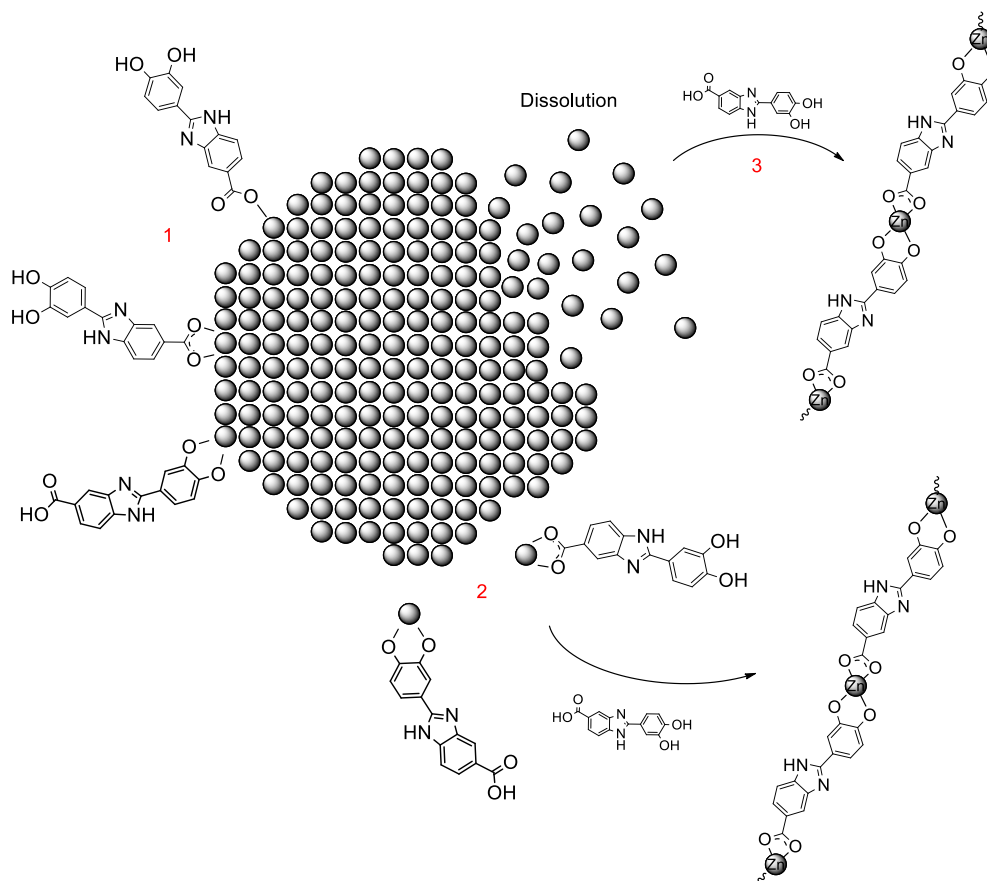


Figura 65. Ipotesi sulla formazione di complessi dello zinco: il ligando promuove la dissoluzione dell'Oxisol® (2) e quindi lo spostamento dell'equilibrio, oppure la dissoluzione si verifica naturalmente nelle particelle di ZnO ma il suo equilibrio di dissoluzione è spostato dalla complessazione da parte dell'Oxisol® (3). Entrambi questi processi avvengono contemporaneamente al coating dello ZnO (1).

Caratterizzazione colloidale (CSA, DLS-ELS, ζ , Velocità di Sedimentazione)

Nonostante i risultati ottenuti portano verso una direzione diversa da quella di un semplice coating delle particelle di ZnO, si è comunque deciso di valutare il potenziale Z e la velocità di sedimentazione.

	DLS (nm) \pm SD	CSA (nm) \pm SD	Velocità di sedimentazione ($\mu\text{m/s}$) \pm SD
ZnO	1612 \pm 290	247.27 \pm 15.2	94.22 \pm 0.5
ZnO-Ox	162 \pm 36	135.37 \pm 1.9	35.90 \pm 1.5
n-ZnO	167 \pm 34	162.63 \pm 1.2	33.91 \pm 0.3
n-ZnO-Ox	46 \pm 39	164.63 \pm 3.2	38.67 \pm 0.8

Tabella 26. La prima e la seconda colonna mostrano i valori della dimensione delle particelle rilevati tramite DLS e CSA. L'ultima colonna mostra il tasso di sedimentazione. A causa delle grandi disomogeneità dei risultati forniti da ZnO non nanometrico, è stata effettuata un'ulteriore analisi in 3 tempi: questo ha permesso di trovare 3 diverse popolazioni di particelle, con dimensioni comprese tra 10 nm e 1600 nm. I tempi di analisi erano: t_0 , t_1 (0,5 ore), t_2 (1,0 ore).

L'analisi DLS si dimostra allineata all'analisi CSA. Inizialmente è stata eseguita una singola analisi DLS per le particelle di ZnO puro. Tale analisi ha mostrato una elevata deviazione standard, caratteristica di sistemi contenenti grandi varietà di particle size. Un primo indizio era già stato osservato al SEM (**Figura 62.A e B**), perciò, per avere conferma definitiva, una seconda analisi è stata svolta analizzando la grandezza delle particelle a tempi differenti [t_0 , t_1 (0.5 ore), t_2 (1 ora)]: ciò ha portato ad ottenere una distribuzione delle particelle da 10 nm a 1600 nm **Tabella 26**. La grande popolazione di particelle nel campione ZnO non nanometrico potrebbe essere alla base della sua reattività (addirittura superiore allo ZnO nanometrico) nei confronti dell'Oxisol[®].

Per quanto riguarda la velocità di sedimentazione, i dati ottenuti sono coerenti con le considerazioni dimensionali. Per quanto riguarda gli ossidi puri, in particolare, aumentando il diametro delle particelle di ZnO, dalla forma nanometrica a quella micrometrica, si osserva un aumento della velocità di sedimentazione (da 33 $\mu\text{m/s}$ a 94 $\mu\text{m/s}$ rispettivamente). L'analisi CSA ha dimostrato che la modificazione della struttura morfologica delle particelle micronizzate dopo la reazione con Oxisol[®] conduce alla formazione di strutture aghiforme con significativo effetto anche sulla velocità di sedimentazione, che si attesta su valori molto simili al corrispettivo nanometrico.

È stata quindi eseguita un'analisi del potenziale Z, i cui risultati sono riportati in **Figura 66**.

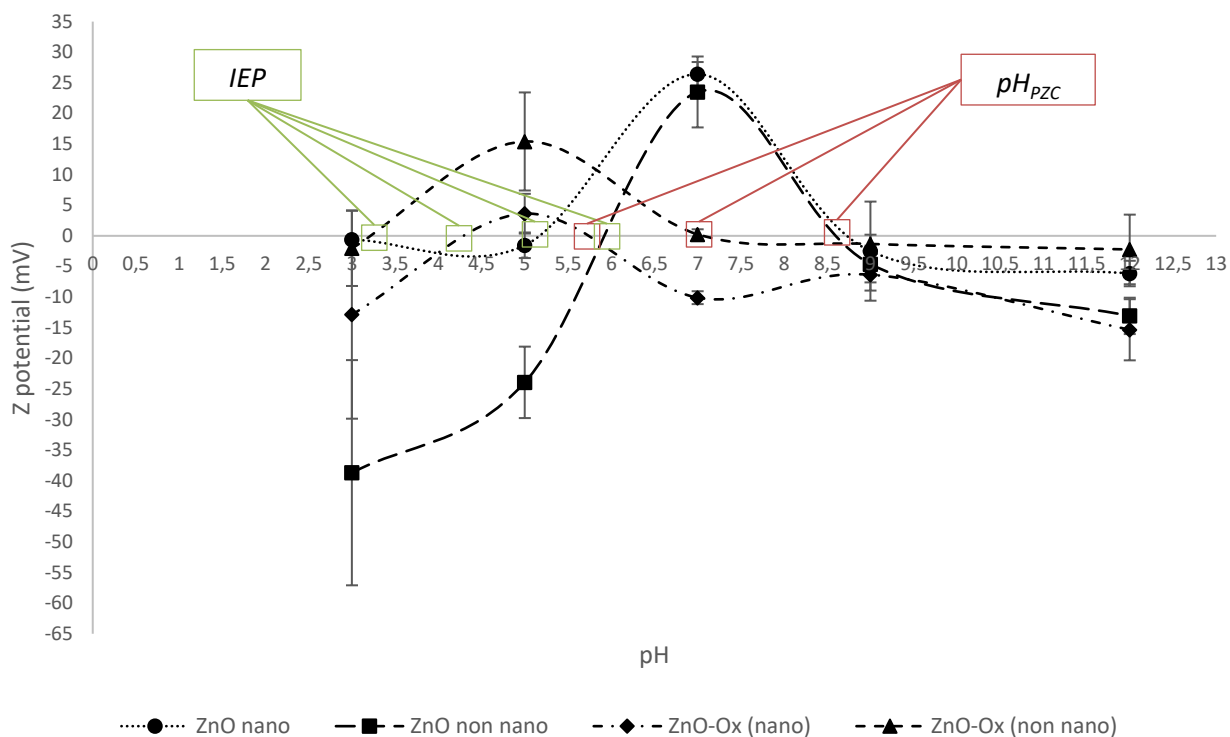


Figura 66. Comportamento del potenziale Z per ogni ZnO, rivestito e non (IEP: punto isoelettrico, pHPZC: pH al quale la carica nulla è raggiunta).

Il comportamento del potenziale Z è allineato con quanto riportato in letteratura per l'ossido di zinco^{45, 46}. Infatti, il motivo per cui il potenziale Z si riduce drasticamente per valori di pH inferiori a 7 potrebbe essere attribuibile alla dissoluzione dello ZnO stesso. Come descritto da Fetehah et al., la dissoluzione di ZnO è causata dalla formazione di $Zn^{2+}_{(aq)}$ e H_2O .

Per le particelle modificate con Oxisol[®], l'interpretazione del potenziale Z risulta essere più difficile a causa del cambiamento delle proprietà chimico-fisiche dei materiali che possono falsare la misura.

SPF *in vitro*

L'addotto (ZnO-Ox) ha mostrato un aumento del valore di SPF rispetto alla semplice miscela (ZnO + Oxisol[®]). Infatti, il legame covalente aumenta il valore SPF portandolo da 2.01 a 4.17 per ZnO nanometrico, e da 2.08 a 3.32 per le specie non nanometriche. Inoltre, il valore di UVA-PF ha subito un incremento significativo solo nel caso dell'ossido di metallo nanometrico. Il rapporto UVA / UVB e il valore critico lambda non mostrano un cambiamento significativo mantenendo gli stessi valori per ciascuna formulazione (dati non mostrati).

Fotochemoluminescenza (PCL)

L'analisi PCL è stata eseguita al fine di valutare l'attività antiossidante, che è correlata alla quantità di gruppi idrossifenolici liberi e quindi, indirettamente, alla stabilità del complesso ZnO-Ox.

I risultati del test condotto sull'attività antiossidante sono mostrati in **Tabella 27**.

Formulation	µmoli TE/grammo
Emulsione con Oxisol® 0.5%	41.96±2.07
Emulsione con miscela (ZnO+Oxisol®)	1.31±0.06
Emulsione con miscela (n-ZnO+Oxisol®)	1.81±0.07
Emulsione con addotto (ZnO-Ox)	1.98±0.05
Emulsione con addotto (n-ZnO-Ox)	1.65±0.04

Tabella 27. Valori di PCL per le emulsioni contenenti ZnO.

I valori di attività antiossidante registrati con questa analisi, purtroppo, non hanno mostrato alcuna conservazione del potere antiossidante: si può ipotizzare che la ragione risiede nella formazione del complesso che inattiva Oxisol®.

Test di rilascio *in vitro*

In analogia a quanto effettuato per TiO₂, è stato determinato il rilascio di Oxisol® al fine di comprendere il comportamento dell'addotto sia nell'emulsione sia quando questi verrà applicato sulla pelle. In principio è stato valutato il rilascio dalle sole particelle (non in emulsione) ed i risultati sono riportati in **Tabella 28**:

Substrato	Solvente	pH	Tempo [h]	Oxisol® rilasciato (%)
Nanometric ZnO	CH ₃ CH ₂ OH/H ₂ O	12.0	4.0±0.5	<1.0
		6.1		<1.0
		2.7		<1.0
	CH ₃ CH ₂ OH	-		<1.0
	H ₂ O	12.0		23.49±1.55
		6.1		9.01±1.80
		2.7		<1.0
12.0		<1.0		
Non nanometric ZnO	CH ₃ CH ₂ OH/H ₂ O	6.1	<1.0	
		2.7	<1.0	
		-	<1.0	
	CH ₃ CH ₂ OH	-	<1.0	
	H ₂ O	12.0	20.76±1.21	
		6.1	6.72±1.34	
		2.7	<1.0	
12.0		<1.0		

Tabella 28. Rilascio di Oxisol® in differenti solventi per le particelle di ZnO.

Nessun rilascio significativo è stato mostrato in etanolo puro e nella miscela etanolo/acqua. I risultati più interessanti sono stati ottenuti per l'acqua pura a pH 12.00 in cui è stato raggiunto il massimo rilascio. Tale evidenza può essere spiegata dal fatto che elevati valori di pH catalizzano l'idrolisi del ligando e, allo stesso tempo, la sua salificazione e di conseguenza la sua solubilizzazione in acqua.

I risultati dello studio sul rilascio di Oxisol® dalle formulazioni contenenti ZnO-Ox sono mostrati nella **Tabella 29**. Questo studio consente di comprendere il comportamento dei materiali quando applicati in emulsione e quindi sulla pelle.

Substrato	Solvente	Tempo [h]	Oxisol® rilasciato (%)
n-ZnO-Ox	H ₂ O 0.90% NaCl	4.0±0.5	8.73±0.34
ZnO-Ox	H ₂ O 0.90% NaCl	4.0±0.5	7.20±0.31

Tabella 29. Rilascio di Oxisol® dalle emulsioni. La percentuale è riferita all'Oxisol® funzionalizzato allo ZnO (ZnO-Ox).

Fotocatalisi

Con la stessa metodologia applicata nel caso del TiO₂ sono stati ricavati i dati riportati in **Tabella 30** al fine di investigare l'influenza del rivestimento sulla attività fotocatalitica.

	Concentrazione [μM]	
Soluzione Blue Acido 9 (Dark)	109.99 \pm 23.59	
Soluzione Blue Acido 9 (UV)	86.50 \pm 18.86	
	Colorante [μM] (n-ZnO)	Colorante [μM] (ZnO)
ZnO-Ox (Dark)	93.68 \pm 20.35	73.07 \pm 16.13
ZnO-Ox (UV)	90.91 \pm 19.73	74.77 \pm 16.50
ZnO (Dark)	91.22 \pm 19.86	86.20 \pm 18.86
ZnO (UV)	2.50 \pm 2.08	2.11 \pm 1.95

Tabella 30. Fotosensibilità del colorante puro, in miscela con ZnO-Ox e con ZnO non trattato. I valori sono riportati come concentrazione dopo il test

I dati riportati in **Tabella 30** confermano una esigua fotosensibilizzazione del colorante, e quindi la sua conformità all'applicazione nel test. Il test viene condotto in duplicato ponendo una delle soluzioni al buio, questo al fine di escludere contributi derivanti dall'adsorbimento del colorante sulla superficie dello ZnO. Si nota che la coordinazione dell'Oxisol[®] estingue efficacemente l'attività fotocatalitica. Tale fenomeno può essere spiegato attraverso due differenti meccanismi: i) ingombro sterico generato dal legante, ii) il legante inietta direttamente l'elettrone nella banda di conduzione dello ZnO, impedendo la formazione della specie h^+ nella banda di valenza con conseguente diminuzione del potere ossidante. Il risultato è comunque una forte diminuzione dell'attività foto ossidativa del filtro fisico funzionalizzato.

Citotossicità

I diversi composti di ZnO sono stati saggiati nei confronti di cellule 3T3 a differenti concentrazioni (1-10-100 $\mu\text{g/ml}$) per valutare un eventuale effetto citotossico.

In **Tabella 31** sono riportati i valori di inibizione di crescita cellulare ricavati alle 48 ore:

Campioni	Concentrazione µg/ml	% Inibizione ± SD
Controllo	0	0.00±0.00
n-ZnO	1	0.15±6.56
	10	61.11±12.30
	100	87.89±0.81
n-ZnO-Ox	1	-9.33±3.80
	10	4.20±4.56
	100	88.02±0.80
ZnO	1	-3.67±5.53
	10	53.25±16.93
	100	87.86±0.85
ZnO-Ox	1	-11.23±6.95
	10	6.58±3.23
	100	87.82±0.96

Tabella 31. Valori di citotossicità ottenuti per concentrazioni di analita di 1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml. La variazione della citotossicità per le concentrazioni di 10 µg/ml è statisticamente significativa (0,001 <valore p <0,01).

Entrambi i composti ZnO (nanometrico e non) hanno mostrato un profilo citotossico dose-dipendente simile, con un'inibizione quasi completa della proliferazione cellulare alla concentrazione di 100 µg/ml, mentre non sono stati osservati effetti alla dose di 1 µg/ml. Gli effetti più interessanti e degni di nota si sono osservati per le concentrazioni di 10 µg/ml. Infatti, mentre ZnO nanometrico e micrometrico hanno mostrato un'inibizione superiore al 50%, le loro controparti funzionalizzate, invece, non hanno mostrato alcun effetto tossico, suggerendo che l'aggiunta di Oxisol[®] conferisce effetti inibitori sulla citotossicità.

La citotossicità dello ZnO è un fenomeno conosciuto in letteratura: le cause possono essere di differente natura, dallo stress ossidativo indotto nelle cellule cutanee umane A431⁴⁷ al rilascio di Zn²⁺ che da inizio ad una “cascata citotossica” che interferisce con flusso di calcio intracellulare, la depolarizzazione mitocondriale che causa anche distruzione della membrana cellulare⁴⁸.

Test di solubilità

Per comprendere meglio il motivo per cui la citotossicità è notevolmente cambiata da ZnO e ZnO-Ox, è stato eseguito un test di solubilità. Infatti, come menzionato nella sezione precedente, se la tossicità di ZnO è collegata direttamente allo ione Zn²⁺, una diminuita

solubilizzazione delle particelle potrebbe essere alla base di questi valori di tossicità. Di seguito sono riportati i valori relativi agli ioni Zn^{2+} presenti in soluzione dopo 48 ore.

	Zn^{2+} (%)			
	n-ZnO	ZnO	n-ZnO-Ox	ZnO-Ox
	85.05±6.0	77.67±6.2	58.61±2.9	39.51±2.4
Condizioni di analisi	Zn^{2+} in solution (%) **			
pH 3	94±6	100±3	102±2	103±2
pH 5	14±1	15±1	36±2	60±3
pH 7	18±1	12±1	34±1	57±2
pH 9	27±1	31±1	42±1	52±2
pH 12	0±0	1±0	7±1	11±1
DMEM* (pH 7.4)	75±4	81±3	81±3	55±1

Tabella 32. Valori percentuali di Zn^{2+} presente in soluzione dopo 48h in differenti condizioni. Il valore corrispondente al 100% è stato attribuito dai campioni sottoposti a digestione. *DMEM è integrato con siero di vitello fetale al 10% (FCS), penicillina (100 U/mL), streptomicina (100 µg/mL) e glutammina (2 mM), vedi materiali e metodi. ** Zn^{2+} percentuale normalizzata per un'efficace concentrazione del campione.

I valori mostrati in **Tabella 32** forniscono informazioni interessanti per spiegare il meccanismo di citotossicità e altre caratteristiche chimico-fisiche del complesso ZnO-Ox. Innanzitutto la solubilizzazione dipende dal pH, con valori acidi che aumentano notevolmente la concentrazione di ioni Zn^{2+} , come descritto da Misra et al.⁴⁹. Questo fornisce supporto ulteriore all'interpretazione del comportamento del potenziale Z mostrato in **Figura 66**, infatti i valori negativi dopo il punto isoelettrico potrebbero essere spiegati ipotizzando la solubilizzazione delle particelle⁴⁶. La seconda informazione degna di nota riguarda la capacità di un ambiente complesso di incrementare la solubilità degli ioni Zn^{2+} , infatti la presenza di DMEM quale solvente conduce ad un aumento della solubilizzazione di zinco⁴⁹. Solo per ZnO-Ox non nanometrico (colonna 5) il comportamento non è stato confermato: la ragione potrebbe essere spiegata dalla forte complessazione dell'Oxisol[®]. La bassa biodisponibilità di Zn^{2+} unita alla sua, già di per sé, minor presenza in campioni funzionalizzati, sono entrambi fattori che consentono di comprendere meglio l'abbattimento della citotossicità nel complesso non nanometrico⁵⁰. Diversamente, lo ZnO-Ox nanometrico mostra una solubilizzazione più elevata (DMEM) ma allo stesso tempo una tossicità molto bassa con un'inibizione della crescita cellulare intorno al 4%: ciò significa che altri meccanismi, oltre alla solubilizzazione, contribuiscono ad una diminuzione della tossicità. Si può ipotizzare, ad esempio, che un rilascio del ligando promosso dall'ambiente biologico consenta l'espressione delle proprietà antiossidanti da parte dell'Oxisol[®], con una conseguente diminuzione della tossicità.

Confrontando i dati di solubilità con quelli di rilascio dell'Oxisol[®] riportati in **Tabella 28**, si può notare che il pH corrispondente ad una maggiore solubilità di ioni Zn²⁺ corrisponde al minor rilascio di Oxisol[®] (pH 3).

Il comportamento della solubilità mostra un picco secondario attorno al pH 9 (**Tabella 32**), nonostante questi valori di pH non dovrebbero portare a una solubilizzazione di ZnO⁵¹.

Attività antiacne

La citotossicità riscontrata ha indotto ad ipotizzare un possibile impiego degli addotti quali agenti antiacne, in particolare contro il *Propionobacterius acnes*. Nei test sono pertanto state confrontate le attività degli addotti con la molecola antiossidante pura e lo ZnO anch'esso puro. In **Tabella 33** sono riportati i valori ottenuti.

MIC – Agar diffusione method

	Microrganismo Propionobacterius acnes (1 µg/ml)	Diametro	Interpretazione alone di inibizione	Risultato attività antimicrobica
ZnO-Ox	$6.00 \cdot 10^6$	4.00	+++	M Mediamente sensibile
Oxisol®	$6.00 \cdot 10^6$	1.9	+	B Bassa sensibilità
ZnO	$6.00 \cdot 10^6$	2.4	++	M Mediamente sensibile

Tabella 33. Capacità inibente nei confronti del Propionibacterium acnes tramite metodica MIC

Legenda:

Interpretazione alone di inibizione				Potere antimicrobico	
-	=	Nessuno	Nessuna efficacia	=	N
+	=	Piccolo	Bassa sensibilità	=	L
++	=	Medio	Mediamente sensibile (Sensibilità intermedia)	=	M
+++	=	Grande	Sensibile	=	S

Tabella 34. Legenda relativa alla metodica MIC

MBC – Dilution method

	Microrganismo Propionobacterius acnes (1 µg/ml)	Risultato dopo tempo di contatto T₁	Riduzione	Risultato potere antimicrobico
ZnO-Ox	$6.00 \cdot 10^6$	$6.40 \cdot 10^5$	98.97%	M Mediamente sensibile
Oxisol®	$6.00 \cdot 10^6$	$2.70 \cdot 10^6$	55.00%	Lieve sensibilità
ZnO	$6.00 \cdot 10^6$	$5.80 \cdot 10^5$	90.33%	M Mediamente sensibile

Tabella 35. Capacità inibente nei confronti del Propionibacterium acnes tramite metodica MBC

Legenda:

Interpretazione					
Punteggio crescita microrganismo		% Riduzione	Risultato del potere antimicrobico		
> +++++	=	0%	Nessuna efficacia	=	N
+++	=	< 90%	Lieve sensibilità	=	L
++	=	98.9-90.0%	Mediamente sensibile	=	M
+	=	99.999-99.0%	Sensibile	=	S

Tabella 36. Legenda relativa alla metodica MBC

Dai risultati ottenuti è osservabile una sostanziale attività antimicrobica sia ad opera dello ZnO-Ox che dello ZnO puro. È comunque interessante notare un aumento di questa attività passando dall'ossido di zinco puro al suo complesso/funzionalizzato.

5.3. TiO₂ @ Acido Ferulico

Caratterizzazione via FT-IR

Nella funzionalizzazione di TiO₂ con acido ferulico sono evidenti la diminuzione del picco attorno ai 3500 cm⁻¹ relativo agli ossidrili liberi dell'acido (gruppo carbossilico e fenolico), inoltre è evidente la diminuzione del C=O carbossilico ed il conseguente splitting a 1500 e 1300 cm⁻¹. Quest'ultima evidenza è indice del fatto che la coordinazione avviene non solo tramite l'ossidrile, ma anche tramite la formazione di un gruppo carbossilato. L'aggiunta dell'acido ferulico a TiO₂, inoltre, è nota in letteratura⁵².

n-TiO₂@AF

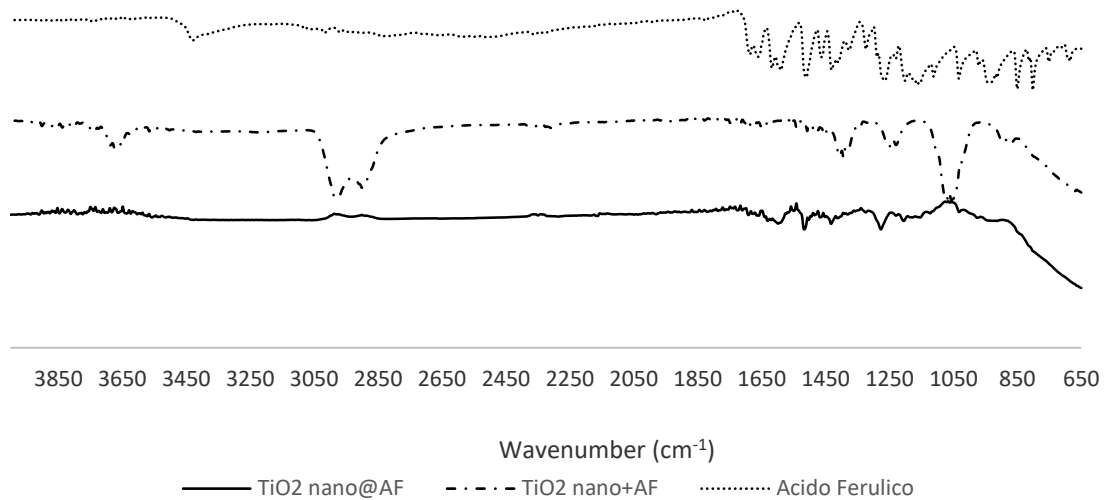


Figura 67. Spettro IR dell'addotto TiO₂ con acido ferulico nella versione nanometrica.

TiO₂@AF

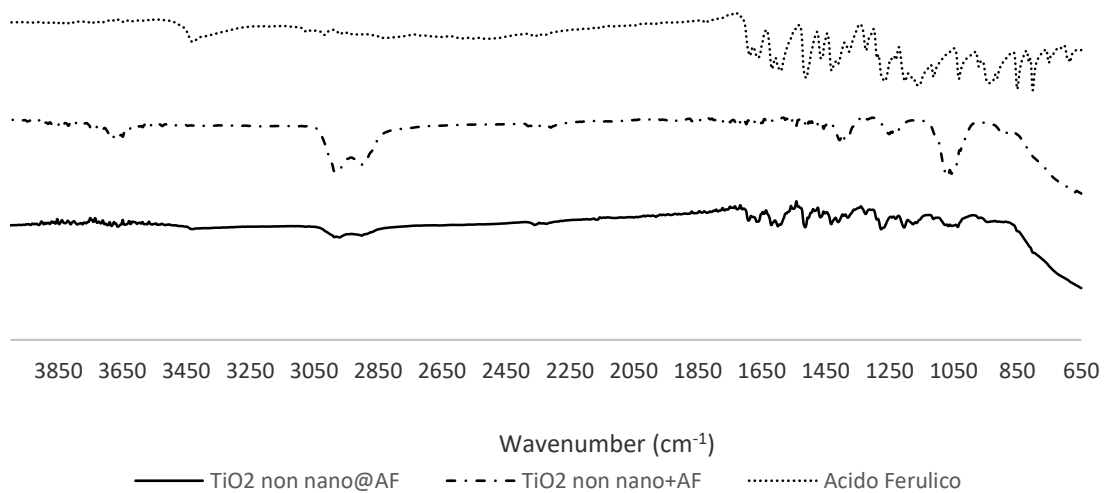
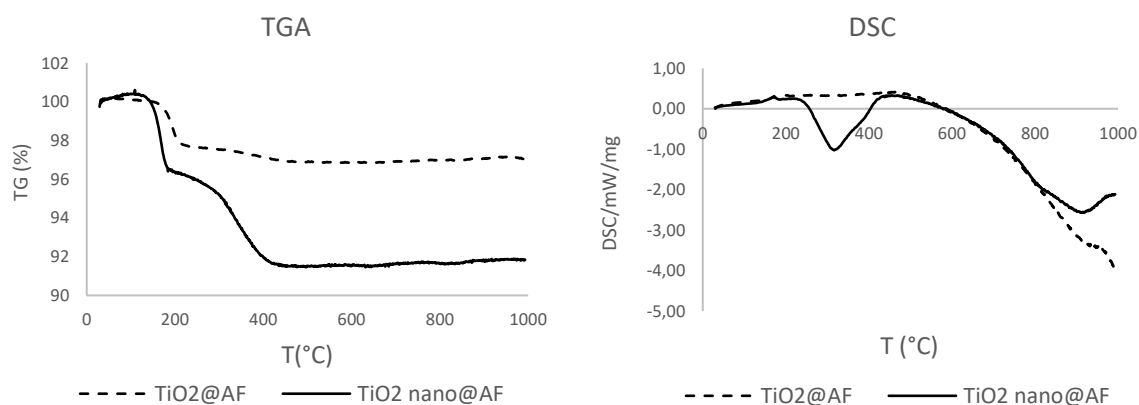


Figura 68. Spettro IR dell'addotto TiO₂ con acido ferulico nella versione non nanometrica.

Analisi termogravimetrica (TGA)



A

B

Figura 69. Analisi TGA (A) e DSC (B) relativo al TiO₂@Acido Ferulico nanometrico e non nanometrico.

Il confronto evidenzia un comportamento simile sia che si tratti del composto nano che non nano. Si osserva una prima perdita tra i 100 e i 225°C associata al picco DSC endotermico, tipica di processi di deidratazione, forse acqua di coordinamento del composto o comunque acqua legata.

Una seconda perdita legata alla combustione della parte organica avviene tra i 225 e i 500°C con largo picco esotermico DSC in due step (circa 315 e circa 390°C), molto evidente nel caso del composto con nano particelle di TiO₂, appena accennato nel caso del TiO₂ non nano.

La reattività potrebbe essere decisamente minore nel caso di particelle non nano con pochissimo attacco di composto organico alle particelle ed una parte di sostanza organica presente sottoforma di miscela fisica.

Le percentuali relative alla funzionalizzazione sono riportate in **Tabella 37**.

	Perdita di peso (%)
TiO₂@Acido Ferulico	3.22±0.2
n-TiO₂@Acido Ferulico	8.87±0.7

Tabella 37. Percentuale di acido ferulico funzionalizzante le particelle di titanio.

Caratterizzazione colloidale (CSA, DLS-ELS, ζ , Velocità di Sedimentazione)

In **Tabella 38** sono riportati i dati di DLS, CSA e velocità di sedimentazione.

	DLS (nm) \pm SD	CSA (nm) \pm SD	Velocità di sedimentazione ($\mu\text{m/s}$) \pm SD
TiO₂	343 \pm 18	523.9 \pm 16.1	251.33 \pm 8.7
TiO₂@AF	140 \pm 2	216.2 \pm 13.3	75.2 \pm 1.7
n-TiO₂	135 \pm 7	187.5 \pm 3.1	26.4 \pm 1.6
n-TiO₂@AF	101 \pm 5	110.6 \pm 23.1	52.2 \pm 2.2

Tabella 38. La prima e la seconda colonna mostrano i valori della dimensione delle particelle rilevati tramite DLS e CSA. L'ultima colonna mostra la velocità di sedimentazione.

Come osservabile dai dati ottenuti, la funzionalizzazione riduce in modo statisticamente significativo il diametro delle particelle, con dati coerenti tra le tecniche DLS e CSA. La diminuzione delle dimensioni particellari, tuttavia, non sembra riflettersi in una diminuzione della velocità di sedimentazione. Questa, infatti, subisce una notevole diminuzione nel caso del TiO₂ non nanometrico, mentre risulta essere addirittura maggiore nel caso delle particelle nanometriche rivestite.

La sperimentazione è proseguita con l'analisi del potenziale Z, nella speranza che il comportamento del nuovo materiale potesse essere ulteriormente chiarito.

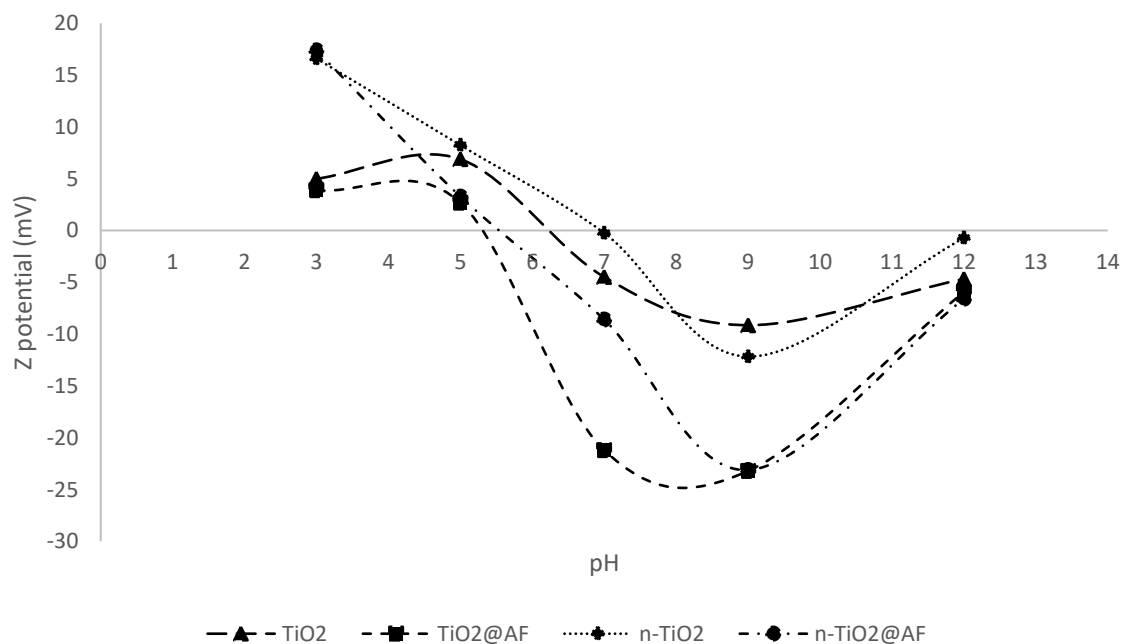


Figura 70. Andamento del potenziale Z al variare del pH.

Il potenziale Z sembra confermare un miglioramento della dispersione dell'addotto a pH basici rispetto alle particelle non rivestite. A pH acidi l'interpretazione diventa più complessa con risultati spesso discordanti tra di loro. Nel complesso si nota un leggero peggioramento rispetto al TiO₂ non rivestito. Il punto isoelettrico è raggiunto a pH 5,5 circa in entrambi gli addotti (nanometrico e non), quindi con uno shift a pH più acidi rispetto ai corrispettivi ossidi non rivestiti. Il rivestimento, quindi, contribuisce positivamente alla dispersione del TiO₂ in ambiente acquoso a pH basici, mentre è meno incisivo quando ci si avvicina alla neutralità oppure a pH più acidi. Questo comportamento potrebbe essere alla base della discrepanza tra analisi CSA e DLS con l'analisi del potenziale Z nel caso del composto nanometrico. Una ulteriore causa può ricercarsi nel coating idrofobico della superficie del TiO₂ ad opera dell'acido ferulico, il quale comporta una minore dispersione nel mezzo acquoso (contributo più incisivo nel caso del nanometrico perché maggiormente rivestito). La sua applicazione in emulsione sarà quindi da eseguire nella fase oleosa. Nel caso del composto non nanometrico, invece, si ritrova un'ottima coerenza tra tutte le analisi eseguite.

SPF *in vitro*

Seguendo le percentuali indicate in **Tabella 37** si è provveduto alla preparazione di differenti emulsioni contenenti l'addotto e la semplice miscela. I test esplorativi secondo metodica Diffey-Robson hanno fornito risultati incoraggianti, pertanto si è proseguito verificando tali risultati secondo normativa ISO 24443-2012. In **Tabella 39** i valori ottenuti secondo metodica ISO.

		SPF	UVA/UVB	λ critica	UVA-PF
n-TiO₂	Crema base	1.03	0.95	290	-
	Acido ferulico alone	1.69	0.87	346	-
	TiO ₂ alone	3.22	0.84	379	3.13
	TiO ₂ +ferulic acid (mix)	5.57	0.8	379	3.02
	TiO ₂ @ferulic acid	4.39	0.85	380	3.19
TiO₂	TiO ₂ alone	2.52	0.86	379	-
	TiO ₂ +ferulic acid (mix)	3.12	0.92	381	3.41
	TiO ₂ @ferulic acid	3.79	0.91	381	3.41

Tabella 39. Valori di SPF ottenuti secondo metodica ISO. I risultati non mostrano variazioni significative tra miscela ed addotto.

Fotochemoluminescenza (PCL)

I valori ottenuti dall'analisi PCL sono riportati in **Tabella 40**.

Formulazione	$\mu\text{moli TE/grammo} \pm \text{SD}$
Base	0.00 \pm 0.00
Base + Acido Ferulico	13.62 \pm 0.33
Acido Ferulico	4277.53 \pm 185.9
n-TiO₂ + Acido Ferulico (Polvere)	214.34 \pm 0.33
n-TiO₂@Acido Ferulico (Polvere)	69.31 \pm 0.48
n-TiO₂ + Acido Ferulico (Emulsione)	10.73 \pm 0.01
n-TiO₂@Acido Ferulico (Emulsione)	13.56 \pm 0.40
TiO₂ + Acido Ferulico (Polvere)	377.39 \pm 0.14
TiO₂@Acido Ferulico (Polvere)	84.72 \pm 2.50
TiO₂ + Acido Ferulico (Emulsione)	7.11 \pm 0.25
TiO₂@Acido Ferulico (Emulsione)	10.38 \pm 0.43

Tabella 40. Valori di PCL relativi al TiO₂ in polvere ed in emulsione.

Come si può osservare dai dati riportati in Tabella, appare evidente una netta diminuzione della capacità antiossidante passando dalla polvere semplicemente miscelata all'addotto. Questo non sorprende in quanto l'aggiunta comporta, almeno in parte, la disattivazione di siti con attività antiossidante, quali i gruppi ossidrilici. Una seconda evidenza, decisamente interessante, riguarda un aumento dell'attività antiossidante (o per lo meno un suo mantenimento) nel caso dell'emulsione passando da miscela ad addotto. Ciò può essere ricercato sia in una diminuzione dell'attività fotocatalitica del TiO₂ (capitolo precedente), ma anche da un possibile rilascio graduale del legante nell'emulsione stessa. Il motivo per il quale l'inibizione fotocatalitica è osservabile nell'emulsione, e non nella miscela, potrebbe risiedere nella presenza di solvente che catalizza i fenomeni di ossidazione tra TiO₂ ed acido ferulico, cosa che accade più lentamente allo stato solido (polvere)⁵³.

Fotocatalisi

L'analisi dell'attività fotocatalitica è stata eseguita come descritto nel capitolo materiali e metodi e precedentemente applicata agli addotti di Oxisol[®]. In **Tabella 41** e **Tabella 42** sono riportati i dati ottenuti.

Campione	Condizione	Concentrazione (μM) \pm SD
Soluzione Acido Blu 9	<i>Dark</i>	83.4 \pm 6.2
	<i>UV-Vis</i>	79.2 \pm 6.5
n-TiO ₂	<i>Dark</i>	75.5 \pm 25.2
	<i>UV-Vis</i>	11.1 \pm 2.1
n-TiO ₂ @AF	<i>Dark</i>	70.4 \pm 17.1
	<i>UV-Vis</i>	70.2 \pm 21.2

Tabella 41. Attività fotocatalitica relativa all'addotto di TiO₂ nanometrico. La diminuzione di assorbanza nel caso della miscela con TiO₂ nanometrico è statisticamente significativa (0.001 < p value < 0.01).

Campione	Condizione	Concentrazione (μM) \pm SD
Soluzione Acido Blu 9	<i>Dark</i>	78.2 \pm 5.1
	<i>UV-Vis</i>	73.3 \pm 5.3
TiO ₂	<i>Dark</i>	72.4 \pm 24.2
	<i>UV-Vis</i>	40.6 \pm 14.1
TiO ₂ @AF	<i>Dark</i>	72.3 \pm 17.5
	<i>UV-Vis</i>	72.8 \pm 21.1

Tabella 42. Attività fotocatalitica relativa all'addotto di TiO₂ non nanometrico. La diminuzione è statisticamente significativa (0.01 < p value < 0.05).

Si nota come il coating con acido ferulico inibisca notevolmente l'attività fotocatalitica dell'ossido di titanio nanometrico. Si nota come la forma nanometrica, in ogni caso, mostri una maggiore attività nei confronti della fotocatalisi rispetto al corrispettivo non nanometrico, questo probabilmente a causa della differenza di area superficiale.

Citotossicità

Il TiO₂ si dimostra sostanzialmente non citotossico, sia nella sua forma nano che non nano, sia con rivestimento di acido ferulico che non. I dati ottenuti saggiando i campioni a diverse concentrazioni (1-10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) su cellule 3T3 coltivate per 48 ore sono riportati in **Tabella 43**.

Sample	Concentrazione $\mu\text{g/mL}$	Inibizione % \pm SD
Controllo	0	0.00 \pm 0.00
	1	0.85 \pm 4.42
n-TiO₂	10	1.49 \pm 9.18
	100	3.08 \pm 9.08
	1	0.00 \pm 0.00
n-TiO₂@AF	10	0.36 \pm 0.63
	100	4.43 \pm 2.81
	1	1.21 \pm 3.43
TiO₂	10	1.90 \pm 2.69
	100	0.30 \pm 10.43
	1	5.53 \pm 6.67
TiO₂@AF	10	0.00 \pm 0.00
	100	11.71 \pm 20.29

Tabella 43. Dati di citotossicità relativi al TiO₂ nanometrico e non. Si può asserire che non vi è citotossicità a nessuna concentrazione.

5.4. ZnO @ Acido Ferulico

Caratterizzazione via FT-IR

L'interpretazione IR dell'addotto di ZnO può essere eseguita attraverso la considerazione dei parametri chiave già distinti nel caso dell'addotto con TiO₂. Anche in questo caso, infatti, nel funzionalizzato sono evidenti la diminuzione del picco attorno ai 3500 cm⁻¹ relativo agli ossidrili liberi dell'acido (gruppo carbossilico e fenolico), e la diminuzione del segnale relativo al C=O carbossilico con conseguente splitting a 1500 e 1300 cm⁻¹. Anche in questo caso, pertanto, si può asserire che la coordinazione avviene tramite l'ossidrile e gruppo carbossilato.

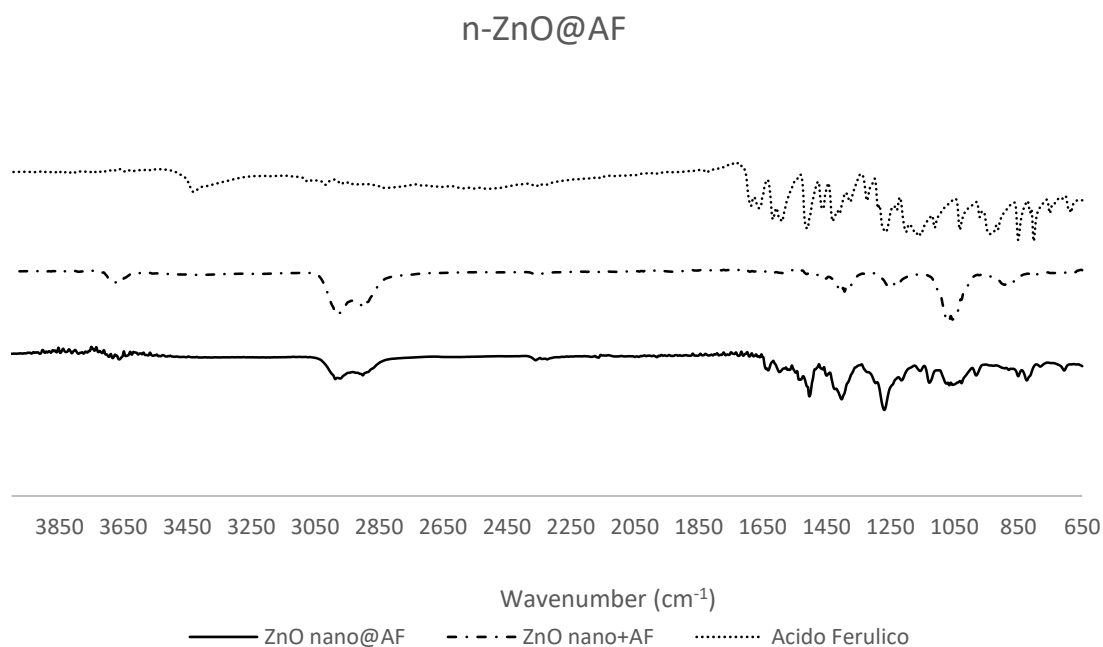


Figura 71. Spettro IR relativo all'addotto nanometrico.

ZnO@AF

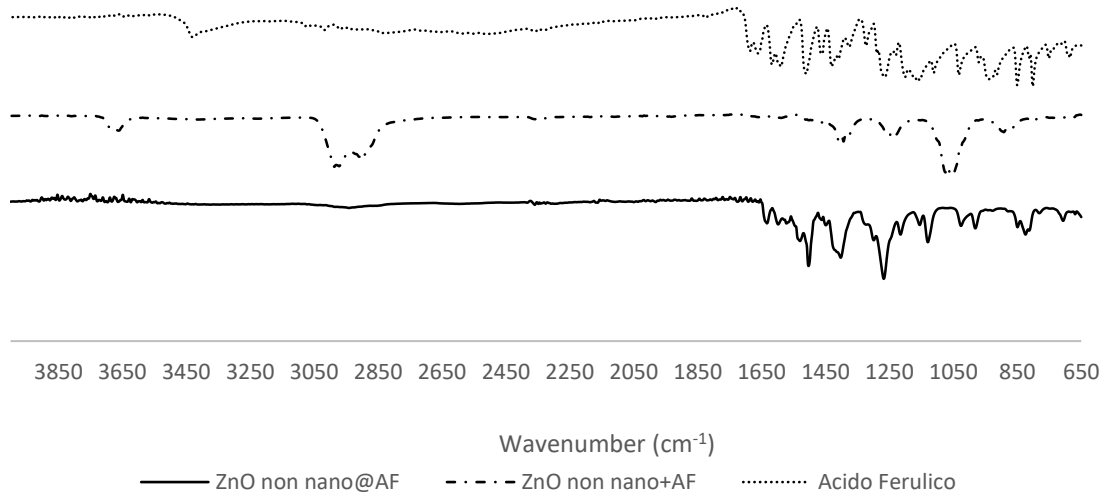
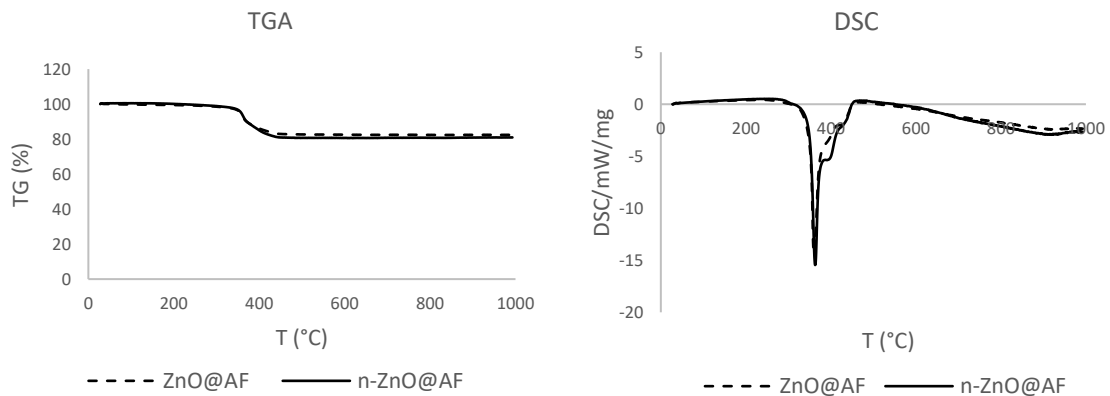


Figura 72. Spettro IR relativo all'addotto non nanometrico.

Analisi termogravimetrica (TGA)



A

B

Figura 73. Analisi TGA (A) e DSC (B) relativo al ZnO@Acido Ferulico nanometrico e non nanometrico.

Il confronto tra ZnO@AF e n-ZnO@AF mette in luce un comportamento termico simile dei due composti. Probabilmente si forma lo stesso tipo di composto, ma con maggiore o minore percentuale relativa di parte organica a seconda della superficie disponibile, che per le nano particelle è maggiore.

Le curve termogravimetriche mostrano una perdita di peso importante tra i 300 °C ed i 400 °C in un doppio step (300-365 °C, 365-450 °C) associate a tre picchi DSC esotermici. Probabilmente la combustione del composto avviene in più step con perdita dei gruppi carbossilici e OH prima e poi completa combustione della molecola.

La variazione di pendenza della curva DSC sopra gli 800 °C è legata alla curva normale di un materiale amorfo.

Si ha una perdita di massa maggiore nel caso del composto nano, probabilmente la maggiore superficie delle particelle permette di ospitare maggiori percentuali di composto organico, questa differenza tra le due fa inoltre pensare che il composto organico sia legato, o per lo meno depositato, sulle particelle e non solo fisicamente mescolato.

Il confronto con i dati di letteratura relativi al complesso acido ferulico-zinco permettono di osservare due importanti differenze: la mancanza della perdita di acqua coordinata al complesso prima dei 200 °C ed un triplo step di combustione invece che un doppio step come accade per il ferulato di zinco. Si può quindi supporre che non vi sia formazione di un complesso e poi deposizione sulle particelle di ZnO nei campioni analizzati (**Figura 74**)⁵⁴.

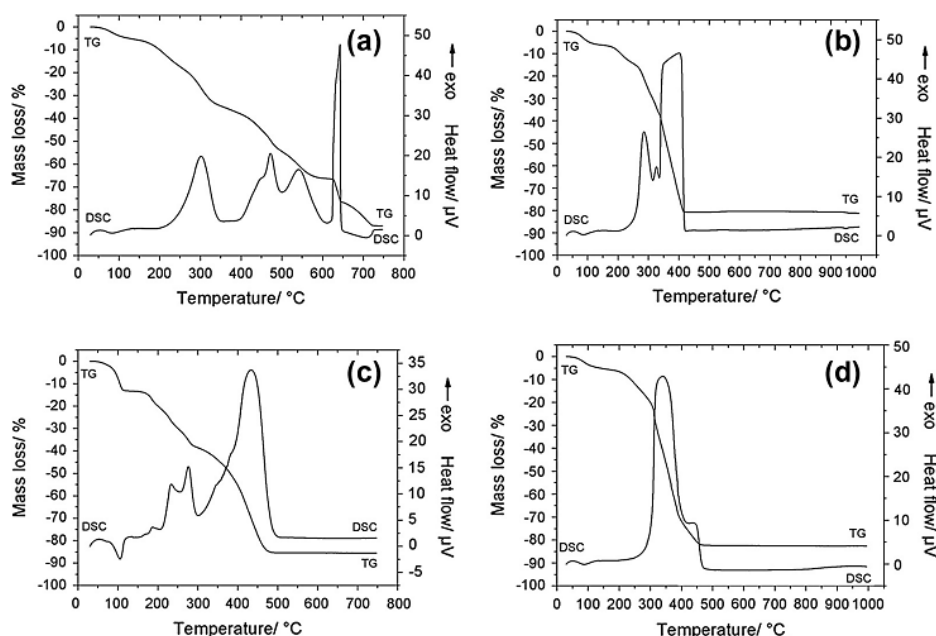


Figura 74. Grafici TGA-DSC relativi a (a) $\text{Ca}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$; (b) $\text{Mn}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$; (c) $\text{Cu}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Zn}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$.

Dalla termogravimetria è quindi stato possibile ottenere le percentuali di funzionalizzazione che vengono riportate in **Tabella 44**.

	Perdita di peso (%)
ZnO@AF	15.61±0.5
n-ZnO@AF	17.91±0.3

Tabella 44. Percentuale di acido ferulico funzionalizzante le particelle di ZnO.

Caratterizzazione colloidale (CSA, DLS-ELS, ζ , Velocità di Sedimentazione)

In **Tabella 45** sono riportati i dati di DLS, CSA e velocità di sedimentazione.

	DLS (nm) \pm SD	CSA (nm) \pm SD	Velocità di sedimentazione ($\mu\text{m/s}$) \pm SD
ZnO	1612±290		
	411.4±59	247.27±15.2	94.22±0.5
	10.7±2		
ZnO@AF	224±11	75.75±5.1	32.65±6.0
n-ZnO	167±34	162.63±1.2	33.91±0.3
n-ZnO@AF	65±5	66.81±2.2	37.2±0.7

Tabella 45. La prima e la seconda colonna mostrano i valori della dimensione delle particelle rilevati tramite DLS e CSA. L'ultima colonna mostra la velocità di sedimentazione.

I dati di DLS e CSA dimostrano una sostanziale coerenza con la funzionalizzazione, la quale riduce efficacemente il diametro delle particelle portando anche ad una omogeneizzazione dello stesso nel caso dello ZnO non nanometrico (riga 2 e 3). Tale diminuzione del diametro particellare si riflette anche in una diminuzione della velocità di sedimentazione, come dimostrato dai valori riportati in colonna 4. Questa diminuzione è evidente e statisticamente significativa nel caso dell'addotto non nanometrico, è invece molto più contenuta e poco significativa dal punto di vista statistico nel caso dell'addotto nanometrico.

Come per il TiO₂ è stata eseguita un'analisi del potenziale Z. I trend vengono descritti dal grafico riportato in **Figura 75**. Andamento del potenziale Z al variare del pH. **Figura 75**.

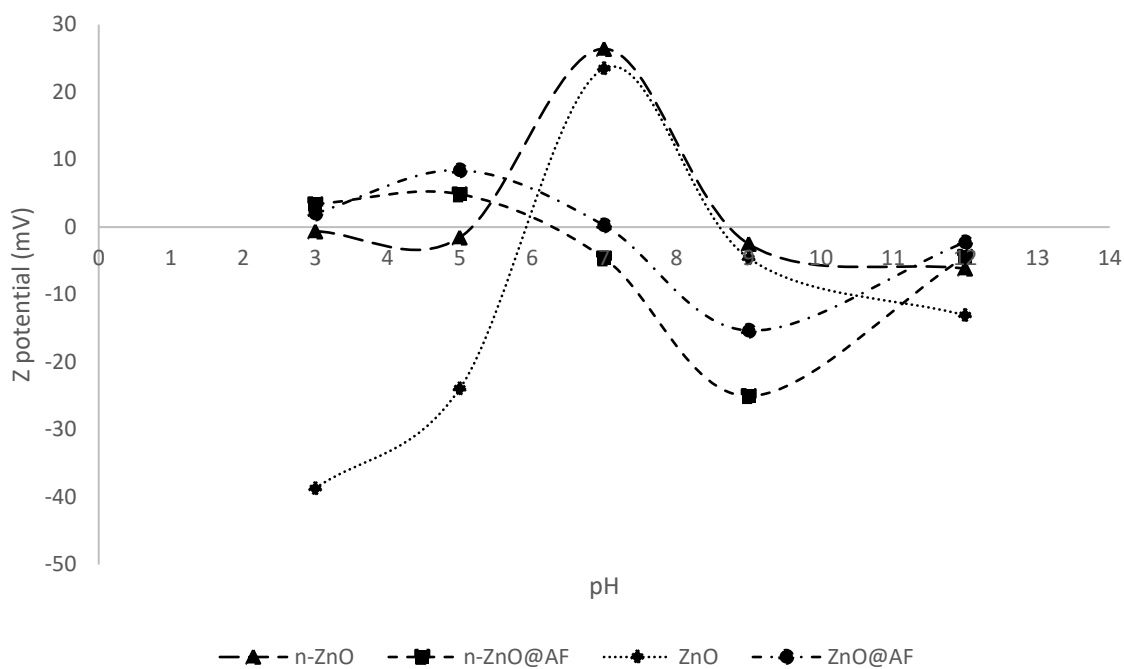


Figura 75. Andamento del potenziale Z al variare del pH.

Il potenziale Z mostra un comportamento caratteristico per lo ZnO non rivestito, con un picco massimo attorno alla neutralità ed un nuovo abbassamento tra pH 5 e 6. Questo andamento, come già accennato nei paragrafi precedenti, è caratteristico della solubilizzazione dell'ossido di zinco a pH acidi. La funzionalizzazione dello ZnO, invece, sembra conferire a questi un comportamento caratteristico di una qualsiasi materiale, con valori di potenziale Z negativi a pH alti e positivi a pH bassi (sebbene una sostanziale tendenza a valori negativi a pH molto acidi). Queste evidenze suggeriscono innanzitutto che la funzionalizzazione mitiga la solubilizzazione dello ZnO, quindi che la diminuzione della velocità di sedimentazione (essendo stata misurata a pH neutri) è da ricercarsi più nell'ingombro sterico del legante organico che in un aumento del potenziale Z.

SPF *in vitro*

Seguendo le percentuali indicate in **Tabella 44** si è provveduto alla preparazione di differenti emulsioni contenenti l'addotto e la semplice miscela. Dapprima è stato eseguito un test SPF esplorativo secondo metodica Diffey-Robson, i cui risultati sono riportati in **Tabella 46**

		SPF	UVA/UVB	λ critica	UVA-PF
n-ZnO	Crema base	1.03	0.95	290	-
	Acido ferulico	1.69	0.87	346	-
	ZnO	2.32	0.95	386	2.21
	ZnO+ferulic acid (mix)	3.32	0.98	385	3.20
	ZnO@ferulic acid	3.28	0.97	385	3.19
ZnO	ZnO	3.03	0.95	385	2.87
	ZnO+ferulic acid (mix)	3.87	0.96	385	3.73
	ZnO@ferulic acid	3.56	0.94	384	3.36

Tabella 46. Valori di SPF ottenuti secondo metodica ISO. I risultati non mostrano variazioni significative tra miscela ed addotto

Non essendo questi test preliminari particolarmente incoraggianti, si è deciso di non approfondire ulteriormente l'attività filtrante secondo metodica ISO 24443-2012.

Fotochemoluminescenza (PCL)

I valori di capacità antiossidante ottenuti mediante metodica PCL sono riportati in **Tabella 47**

Formulazione	μmoli TE/grammo ± SD
Base	0.00±0.00
Base + Acido Ferulico	13.62±0.33
Acido Ferulico	4277.53±185.9
n-ZnO + AF (Polvere)	161.07±10.11
n-ZnO@AF (Polvere)	48±0.71
n-ZnO + AF (Emulsione)	1.59±0.04
n-ZnO@AF (Emulsione)	1.96±0.14
ZnO + AF (Polvere)	182.02±10.42
ZnO@AF (Polvere)	32.53±3.40
ZnO + AF (Emulsione)	1.35±0.02
ZnO@AF (Emulsione)	1.48±0.46

Tabella 47. Valori di PCL relativi al TiO₂ in polvere ed in emulsione.

Come nel caso dell'ossido di titanio è osservabile una netta diminuzione della capacità antiossidante passando dalla polvere miscelata all'addotto. Infatti, anche nel caso dello ZnO,

l'aggiunta comporta, almeno in parte, la disattivazione di siti con attività antiossidante, quali i gruppi ossidrilici. Anche con l'ossido di zinco si nota una, seppur minima, attività antiossidante che viene mantenuta paragonabile in entrambe le specie (miscela ed addotto) quando queste sono applicate in formulazione. I valori non sono tuttavia così elevati da poter vantare un'effettiva attività antiossidante delle emulsioni ottenute.

Fotocatalisi

La metodica rimane la stessa precedentemente impiegata per gli addotti di Oxisol[®] ed acido ferulico al TiO₂. I risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 48** e **Tabella 49**.

Campione	Condizione	Concentrazione (µM) ± SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	73.9±3.4
	<i>UV-Vis</i>	71.5±3.3
n-ZnO	<i>Dark</i>	51.5±12.8
	<i>UV-Vis</i>	15.8±5.2
n-ZnO@AF	<i>Dark</i>	53.7±15.2
	<i>UV-Vis</i>	52.1±19.1

Tabella 48. Attività fotocatalitica relativa all'addotto di ZnO nanometrico. La diminuzione di assorbanza nel caso della miscela con ZnO nanometrico è statisticamente significativa (0.001 < p value < 0.01).

Campione	Condizione	Concentrazione (µM) ± SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	75.1±3.2
	<i>UV-Vis</i>	73.3±4.1
ZnO	<i>Dark</i>	66.8±15.3
	<i>UV-Vis</i>	43.6±11.8
ZnO@AF	<i>Dark</i>	68.4±19.7
	<i>UV-Vis</i>	66.7±25.2

Tabella 49. Attività fotocatalitica relativa all'addotto di ZnO non nanometrico. La diminuzione è statisticamente significativa (0.01 < p value < 0.05).

Si nota come il coating con acido ferulico inibisca notevolmente l'attività fotocatalitica dell'ossido di titanio nanometrico. Si nota come la forma nanometrica, in ogni caso, mostri una maggiore attività nei confronti della fotocatalisi rispetto al corrispettivo non nanometrico, questo probabilmente a causa della differenza di area superficiale.

Citotossicità

Anche per lo ZnO sono stati eseguiti test di citotossicità *in vitro* su cellule 3T3 coltivate per 48 ore. I valori dei campioni testati a diverse concentrazioni (1-10-100 µg/ml) sono riportati in **Tabella 50**

Campione	Concentrazione µg/mL	% Inibizione ± SD
Controllo	0	0.00±0.00
	1	7.08±7.34
n-ZnO	10	61.11±21.30
	100	87.89±1.40
n-ZnO@AF	1	3.41±2.55
	10	15.86±8.81
	100	87.03±0.29
ZnO	1	6.14±7.45
	10	53.25±29.33
	100	87.86±1.46
ZnO@AF	1	7.91±12.48
	10	16.33±10.14
	100	86.22±1.06

Tabella 50. Dati di citotossicità relativi al TiO₂ nanometrico e non. Si può asserire che non vi è citotossicità a nessuna concentrazione.

La citotossicità segue il medesimo trend già riscontrato per l'addotto con Oxisol[®], dimostrando di essere dose dipendente. Si nota infatti un evidente effetto citotossico dello ZnO@AF ad elevate concentrazioni (100 µg/ml) ma un abbattimento della sua attività già a 10 µg/ml se confrontato con il corrispettivo ossido di zinco non rivestito. Nessuna attività è invece osservata a concentrazioni minime di 1µg/ml.

Attività antiacne

I dati di citotossicità ottenuti con lo ZnO hanno portato ad ipotizzare un possibile impiego degli addotti per il contrasto dell'acne, in particolare andando a misurare la capacità di inibizione del *Propionobacterius acnes*. È stato preso in considerazione l'addotto ZnO@AF. L'addotto è stato confrontato con la singola molecola antiossidante di acido ferulico. I risultati sono riportati in **Tabella 51** e **Tabella 52**.

MIC – Agar diffusione method

	Microrganismo <i>Propionobacterius acnes</i> (1 µg/ml)	Diametro	Interpretazione alone di inibizione	Risultato attività antimicrobica
ZnO@AF	6.00·10 ⁶	2.7	++	M Mediamente sensibile
Acido Ferulico	6.00·10 ⁶	1.0	+	B Bassa sensibilità
ZnO	6.00·10 ⁶	2.4	++	M Mediamente sensibile

Tabella 51. Capacità inibente nei confronti del Propionibacterium acnes tramite metodica MIC.

Legenda:

Interpretazione alone di inibizione				Potere antimicrobico	
-	=	Nessuno	Nessuna efficacia	=	N
+	=	Piccolo	Bassa sensibilità	=	L
++	=	Medio	Mediamente sensibile (Sensibilità intermedia)	=	M
+++	=	Grande	Sensibile	=	S

Tabella 52. Legenda relativa alla metodica MIC.

MBC – Dilution method

	Microrganismo <i>Propionobacterius acnes</i> (1 µg/ml)	Risultato dopo tempo di contatto T ₁	Riduzione	Risultato potere antimicrobico
ZnO@AF	6.00·10 ⁶	2.10·10 ⁵	96.50%	M Mediamente sensibile
Acido Ferulico	6.00·10 ⁶	3.80·10 ⁶	36.67%	L Lieve sensibilità
ZnO	6.00·10 ⁶	5.80·10 ⁵	90.33%	M Mediamente sensibile

Tabella 53. Capacità inibente nei confronti del Propionibacterium acnes tramite metodica MBC.

Legenda:

Interpretazione					
Punteggio crescita microrganismo		% Riduzione	Risultato del potere antimicrobico		
> ++++	=	0%	Nessuna efficacia	=	N
+++	=	< 90%	Lieve sensibilità	=	L
++	=	98.9-90.0%	Mediamente sensibile	=	M
+	=	99.999-99.0%	Sensibile	=	S

Tabella 54. Legenda relativa alla metodica MBC.

Come nel caso dell'addotto con Oxisol[®], anche in questo caso l'addotto dimostra un'attività di inibizione del battere responsabile dell'acne maggiore sia del semplice antiossidante che dello ZnO puro, con entrambe le metodiche.

5.5. TiO₂ @ Acido Ellagico, ZnO @ Acido Ellagico

Caratterizzazione via FT-IR

La caratterizzazione dell'addotto è stata eseguita attraverso spettroscopia FT-IR.

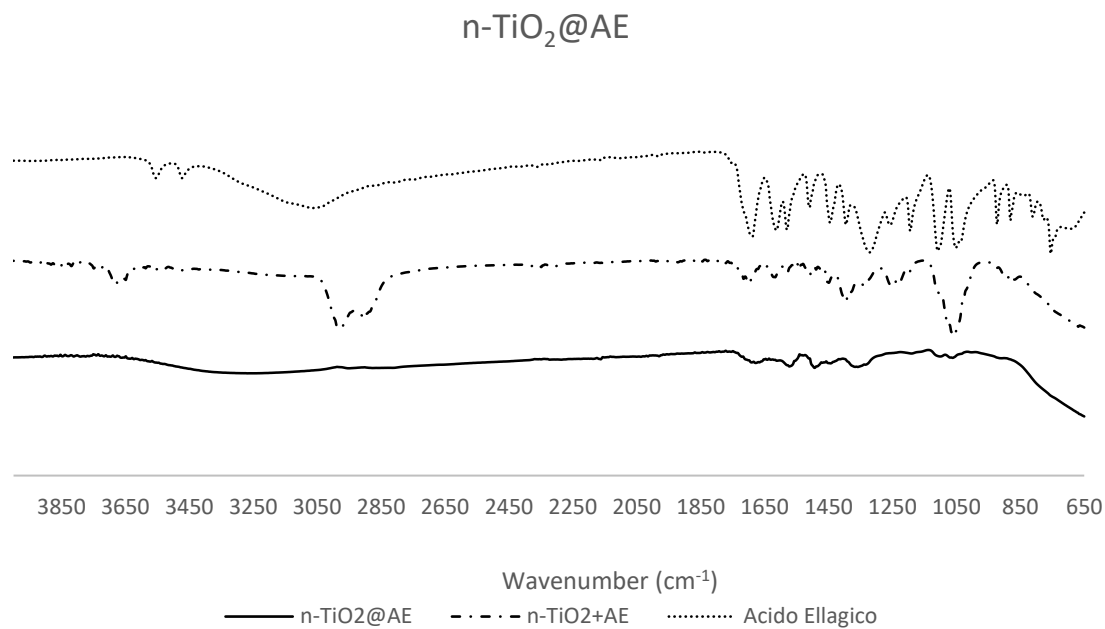


Figura 76. Spettro IR relativo all'addotto nanometrico di TiO₂.

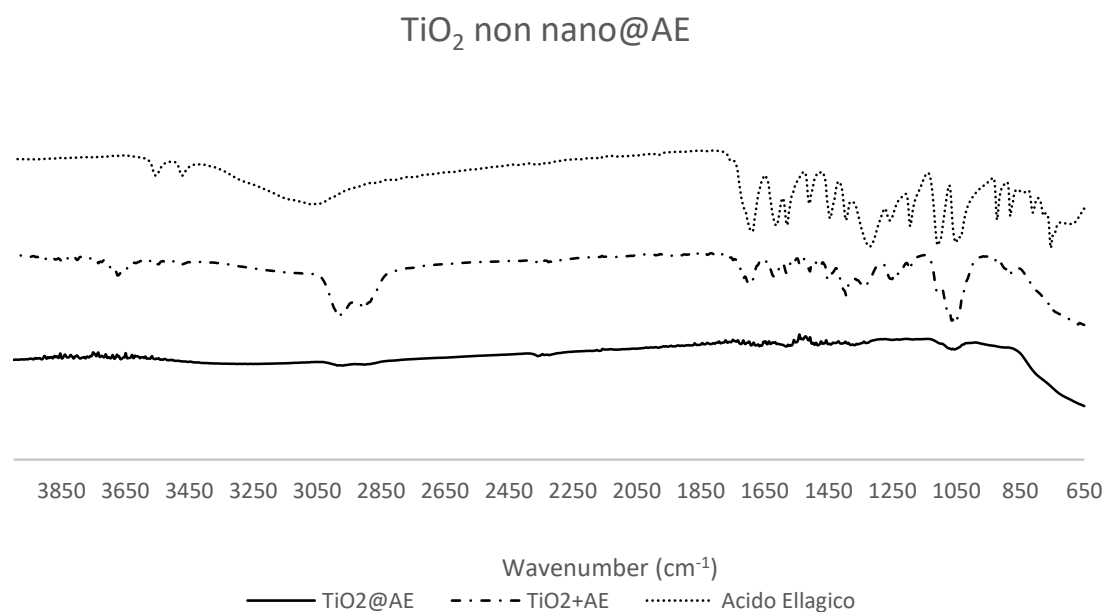


Figura 77. Spettro IR relativo all'addotto non nanometrico di TiO₂.

La coordinazione dell'acido ellagico avviene attraverso gli ossidrili degli anelli catecolici della molecola. Tale evidenza è supportata dalla spettroscopia IR (**Figura 76** e **Figura 77**) che dimostra la scomparsa a 3600-3500 cm^{-1} dei picchi relativi allo stretching O-H degli ossidrili liberi.

Purtroppo, nonostante i numerosi lavaggi, non è stato possibile eliminare in modo soddisfacente la trietanol ammina (TEA) in eccesso. Un'analisi più approfondita dello spettro IR dell'addotto, infatti, ha evidenziato la presenza di TEA con un picco caratteristico dello stretching amminico a 1215 cm^{-1} circa. Oltretutto il prodotto non si presentava più come una polvere facilmente lavorabile ma come un agglomerato estremamente duro e compatto.

La medesima problematica è stata riscontrata anche per l'addotto di ZnO, di cui si riportano gli spettri IR in **Figura 78** e **Figura 79**.

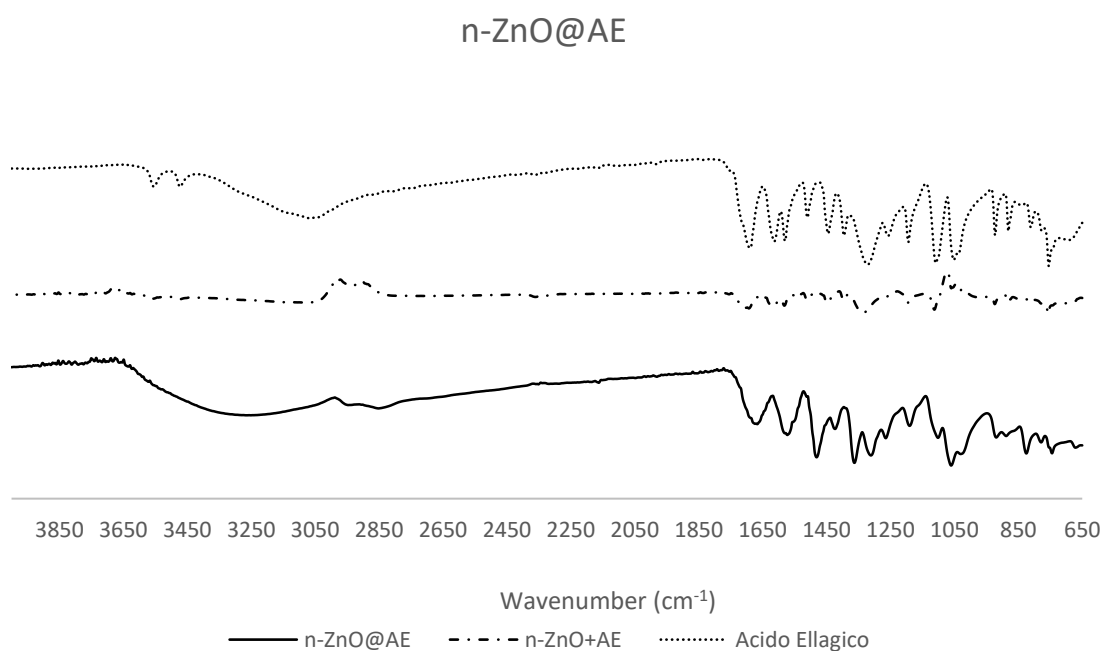


Figura 78. Spettro IR relativo all'addotto nanometrico di ZnO.

ZnO@AE

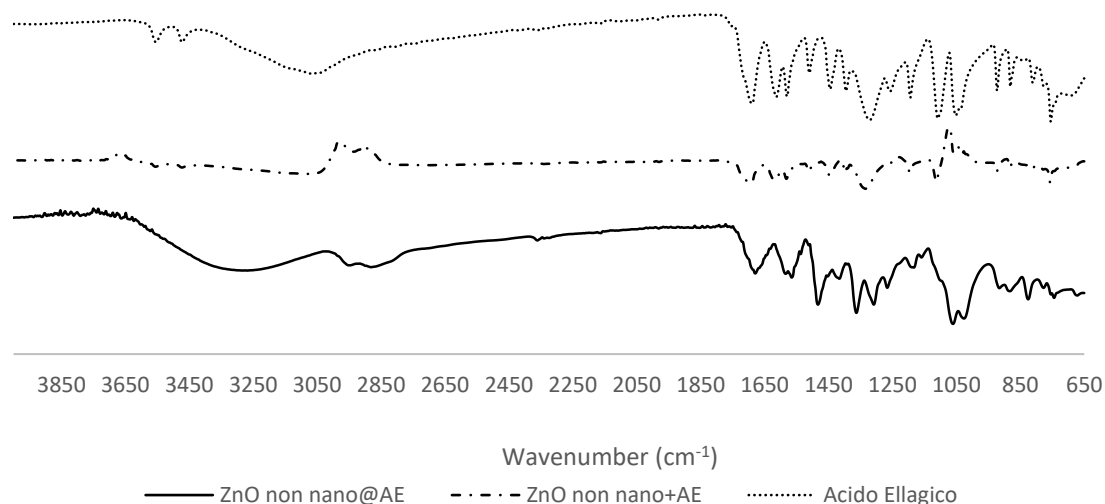


Figura 79. Spettro IR relativo all'addotto non nanometrico di ZnO.

La difficoltà nel lavaggio dell'addotto, unitamente alla difficoltà di una sua lavorazione in ambito cosmetico hanno fatto propendere per migliorare la metodologia di sintesi prima di poter condurre ulteriori studi. L'unico test che si è comunque voluto portare avanti nonostante le problematiche sopra elencate è stato quello fotocatalitico che verrà di seguito riportato.

Fotocatalisi

La metodologia applicata è stata la medesima degli altri addotti precedentemente ottenuti.

Campione	Condizione	Concentrazione (mM)±SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	83.2±6.9
	<i>UV-Vis</i>	79.9±6.1
n-TiO ₂	<i>Dark</i>	75.4±25.3
	<i>UV-Vis</i>	11.3±2.1
n-TiO ₂ @AE	<i>Dark</i>	70.4±22.3
	<i>UV-Vis</i>	72.1±20.2

Tabella 55: Diminuzione della fotocatalisi per il TiO₂ nanometrico.

Campione	Condizione	Concentrazione (μM) \pm SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	0.73.2 \pm 0.03.3
	<i>UV-Vis</i>	0.71.1 \pm 0.03.5
TiO ₂	<i>Dark</i>	0.51.8 \pm 0.12.5
	<i>UV-Vis</i>	0.15.3 \pm 0.05.6
TiO ₂ @AE	<i>Dark</i>	0.64.4 \pm 0.20.3
	<i>UV-Vis</i>	0.64.6 \pm 0.21.9

Tabella 56. Diminuzione della fotocatalisi per il TiO₂ non nanometrico.

Campione	Condizione	Concentrazione (μM) \pm SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	78.8 \pm 5.5
	<i>UV-Vis</i>	73.2 \pm 5.3
n-ZnO	<i>Dark</i>	72.1 \pm 24.8
	<i>UV-Vis</i>	40.5 \pm 8.1
n-ZnO@AE	<i>Dark</i>	73.4 \pm 22.2
	<i>UV-Vis</i>	71.6 \pm 20.6

Tabella 57. Diminuzione della fotocatalisi per lo ZnO nanometrico.

Campione	Condizione	Concentrazione (μM) \pm SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	75.2 \pm 3.1
	<i>UV-Vis</i>	73.3 \pm 4.6
ZnO	<i>Dark</i>	66.5 \pm 15.8
	<i>UV-Vis</i>	43.4 \pm 11.2
ZnO@AE	<i>Dark</i>	66.1 \pm 20.1
	<i>UV-Vis</i>	66.3 \pm 21.3

Tabella 58. Diminuzione della fotocatalisi per lo ZnO non nanometrico.

Si osserva una netta diminuzione dell'attività fotocatalitica nel caso della funzionalizzazione per tutte le specie, sia nanometriche che non. Tuttavia, come accennato nel capitolo precedente, il prodotto ottenuto si presentava come una massa compatta e solida e non come una polvere. Nonostante questa massa sia stata levigata in mortaio al fine di renderla polverosa, è probabile che comunque una buona parte dell'inibizione della fotocatalisi sia dovuta alla diminuzione di area superficiale derivante dall'agglomerazione durante la sintesi.

5.6. n-TiO₂ @ Avobenzone

Caratterizzazione via FT-IR

La caratterizzazione dell'addotto è stata eseguita attraverso spettroscopia FT-IR.

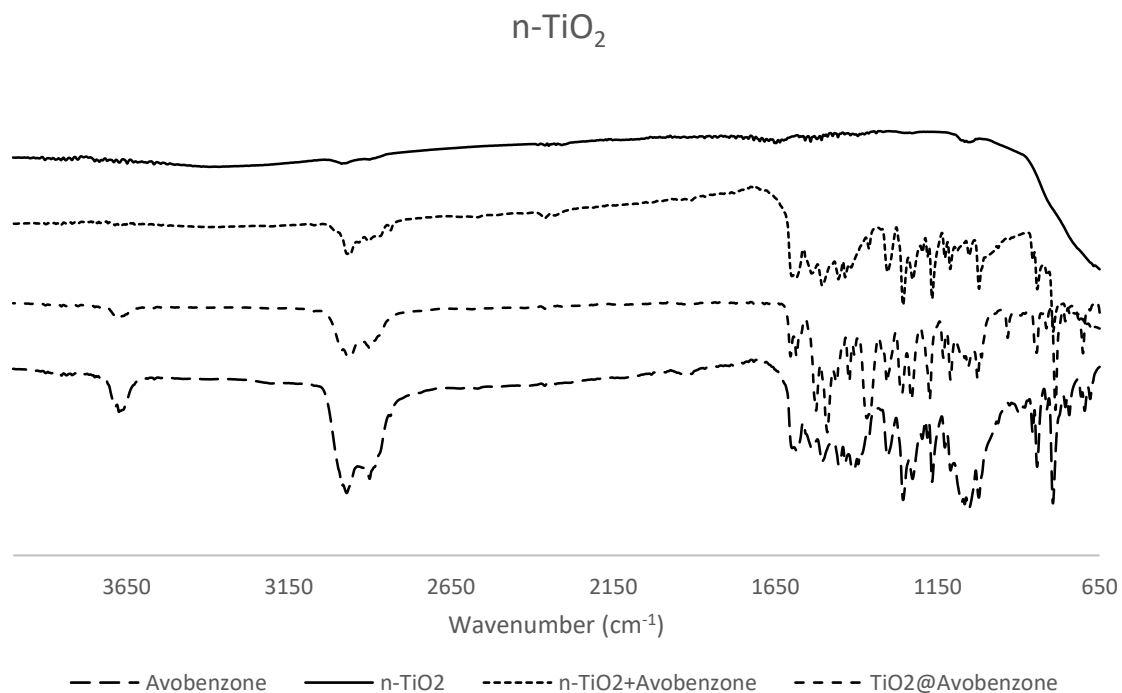


Figura 80. Spettro IR relativo alle varie declinazioni di TiO₂ con avobenzone.

Anche in questo caso, per approfondire la natura del nuovo prodotto, è stata effettuata una spettroscopia FT-IR. Il TiO₂ non rivestito (**Figura 80**) mostrava un picco di assorbimento forte e ampio al di sotto di 800 cm⁻¹ che è caratteristico della vibrazione di stretching del legame Ti - O. Un' ampia banda a 3700 cm⁻¹ è relativo allo stretching O - H del gruppo funzionale ossidrilico e il picco a 1.634 cm⁻¹ è attribuito bending della superficie H - OH (Zhou et al. 2012). Il campione di TiO₂ rivestito sembra molto simile a quello dello spettro non rivestito, tranne che per il forte ed ampio picco a 400-800 cm⁻¹ che sembra aumentare la sua ampiezza. Poiché questa regione è caratterizzata dallo stretching del Ti - O, è possibile che l'effetto di aumento dell'ampiezza sia dovuto alla debole interazione chimica tra avobenzone e TiO₂. La molecola di curcumina ha al centro uno dei gruppi funzionali più importanti - il gruppo b-dichetone - al fine di stabilire la chelazione dello ione metallico. È pertanto ipotizzabile una chelazione dell'atomo di Ti secondo lo schema⁵⁵:

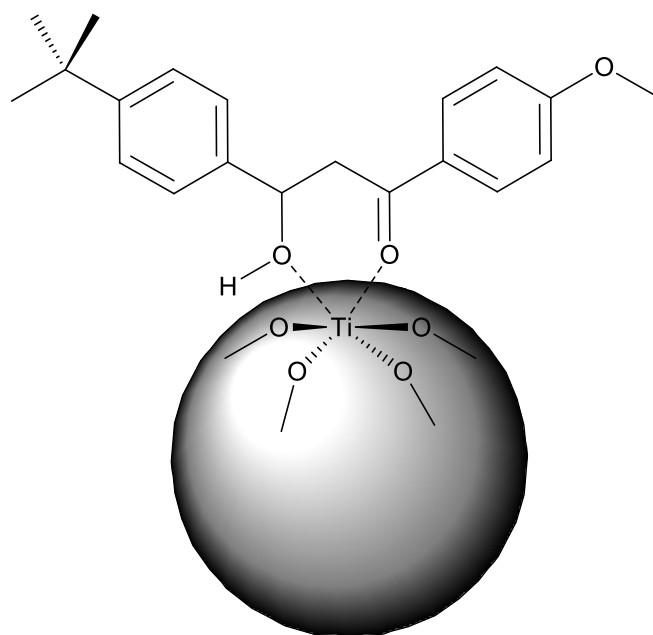


Figura 81. Ipotesi di coordinazione del legante Avobenzone alla particella di TiO₂.

Le bande di assorbimento dell'avobenzone a 1.600 cm^{-1} possono essere assegnate alla vibrazione stretching dell'anello benzenico stesso, mentre a circa $1.200\text{--}1.300\text{ cm}^{-1}$ si osserva lo stretching del C – O etereo.

Per confronto, una polvere mista di avobenzone e TiO₂ è stata preparata mescolando fisicamente le due polveri (1:1 p/p). Si può vedere che lo spettro FT-IR della miscela mostra componenti caratteristiche sia dell'avobenzone puro che del TiO₂, in particolare nella regione da $800\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$ si nota l'andamento caratteristico dell'ossido di titanio. L'addotto possiede un andamento completamente differente in questa parte dello spettro, ragion per cui è plausibile considerare la formazione di una nuova specie (n-TiO₂@Avobenzone).

Analisi termogravimetrica (TGA)

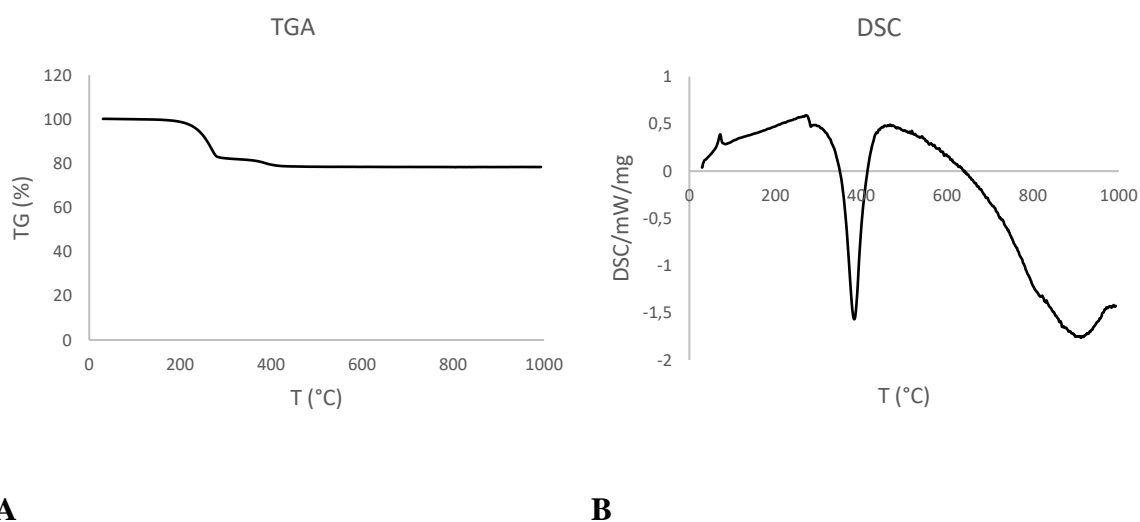


Figura 82. Analisi TGA e DLS relative all'addotto sintetizzato.

In **Figura 82** si osserva un picco esotermico molto chiaro a 72 °C a cui non è associata una perdita di massa, questo è caratteristico delle transizioni di fase, presumibilmente un melting point.

Un piccolo picco DSC esotermico a 283°C si accompagna ad una perdita di massa notevole (17,68), mentre un picco maggiore esotermico a 384°C si accompagna ad un'ulteriore perdita di massa di 3,81% legata probabilmente alla combustione totale del composto.

Il tracciato è molto differente da quanto riportato in letteratura per il solo avobenzone (**Figura 83** e **Figura 84**), tuttavia il secondo picco dsc è simile a quello di avobenzone a cui ne segue il terzo²⁹, come mostrato in **Figura 84**.

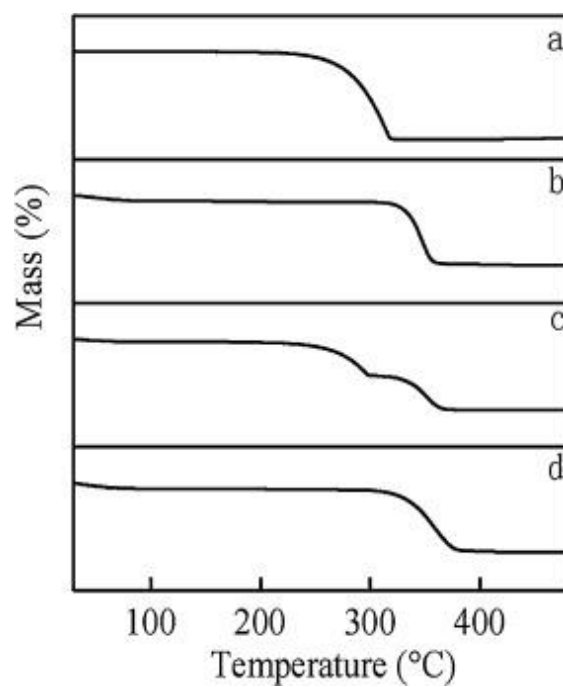


Figura 83. Curve termogravimetriche (a) avobenzone, (b) 2-HP- β -CD, (c) avobenzone/2-HP- β -CD physical mixture, (d) avobenzone-2-HP- β -CD inclusion complex.

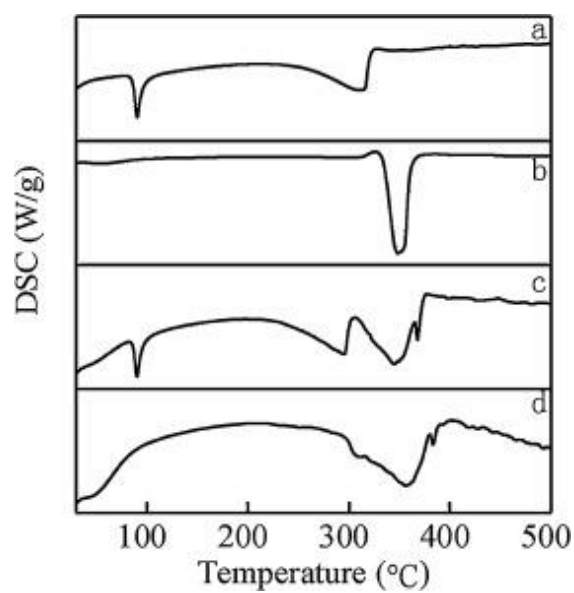


Figura 84. Curve DSC relative a (a) avobenzone, (b) 2-HP- β -CD, (c) avobenzone/2-HP- β -CD physical mixture, (d) avobenzone-2-HP- β -CD inclusion complex.

Caratterizzazione colloidale (CSA, DLS-ELS, ζ , Velocità di Sedimentazione)

In **Tabella 59** sono riportati i dati di DLS, CSA e velocità di sedimentazione.

	DLS (nm) \pm SD	CSA (nm) \pm SD	Velocità di sedimentazione ($\mu\text{m/s}$) \pm SD
n-TiO₂	135 \pm 7	187.5 \pm 3.1	26.4 \pm 1.6
n-TiO₂@Avobenzone	54 \pm 5	69.7 \pm 16.9	39.2 \pm 0.1

Tabella 59. La prima e la seconda colonna mostrano i valori della dimensione delle particelle rilevati tramite DLS e CSA. L'ultima colonna mostra la velocità di sedimentazione.

È evidente una netta diminuzione del diametro delle particelle quando queste sono rivestite con Avobenzone. Sebbene non eccessivo, è invece osservabile un aumento della velocità di sedimentazione della forma rivestita, contrariamente a quanto ci si aspetterebbe.

Come per gli altri addotti di TiO₂ è stata eseguita un'analisi del potenziale Z. I trend vengono descritti dal grafico sottostante.

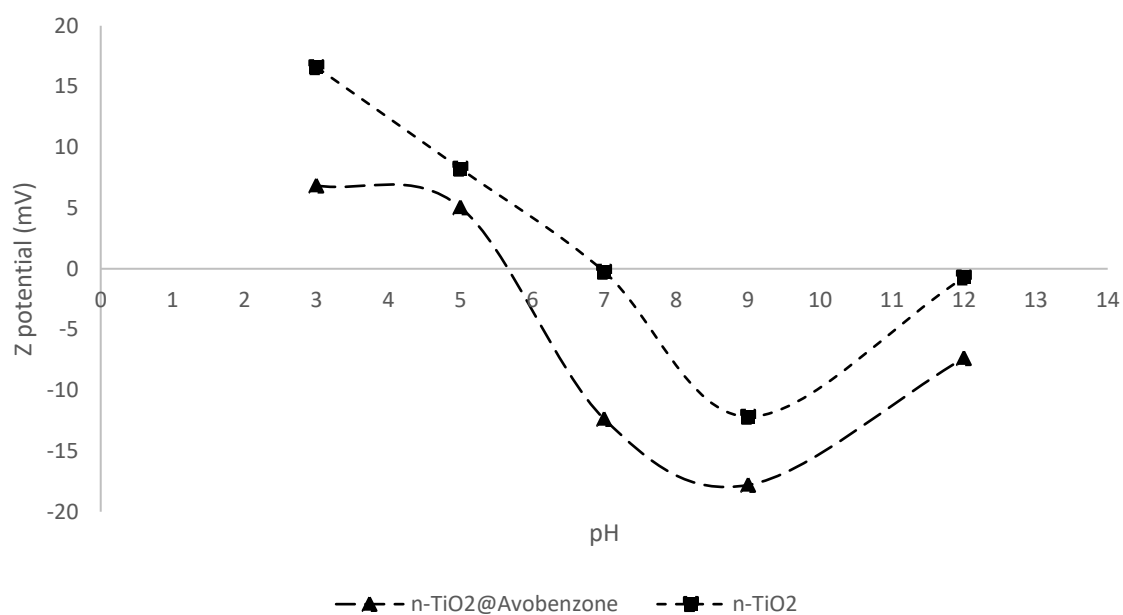


Figura 85. Andamento del potenziale Z al variare del pH.

I potenziali Z sono paragonabili tra di loro. Si osserva tuttavia una traslazione a valori inferiori nel caso del rivestimento.

Fotocatalisi

La metodologia applicata è stata la medesima degli altri addotti precedentemente ottenuti.

Campione	Condizione	Concentrazione (μM) \pm SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	81.2 \pm 8.3
	<i>UV-Vis</i>	79.3 \pm 8.1
n-TiO ₂	<i>Dark</i>	74.4 \pm 7.3
	<i>UV-Vis</i>	07.2 \pm 1.1
n-TiO ₂ @Avobenzone	<i>Dark</i>	79.9 \pm 9.9
	<i>UV-Vis</i>	79.1 \pm 8.4

Tabella 60. Diminuzione della fotocatalisi per il TiO₂ nanometrico.

Come nei precedenti addotti si è notata una diminuzione della concentrazione di colorante passando da TiO₂ puro a rivestito. Anche in questo caso è plausibile un contributo alla diminuzione derivante sia dall'inibizione della formazione di h⁺ nella banda di valenza, sia all'ingombro sterico. Al fine di verificare questo fenomeno, si è eseguito nuovamente il test di fotocatalisi ponendo però i campioni all'esposizione di una luce visibile con sorgente una lampada da 18 W, in accordo con Budee et al.⁵⁵. Questo test è stato eseguito in un arco temporale di 48h ed i risultati sono sotto riportati:

Campione	Condizione (48h)	Concentrazione (μM) \pm SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	90.2 \pm 7.8
	<i>Vis</i>	90.3 \pm 8.6
n-TiO ₂	<i>Dark</i>	87.8 \pm 7.4
	<i>Vis</i>	86.1 \pm 5.1
n-TiO ₂ @Avobenzone	<i>Dark</i>	89.9 \pm 9.3
	<i>Vis</i>	72.7 \pm 8.2

Tabella 61. Degradazione del colorante in seguito a 48h di esposizione alla radiazione visibile.

È interessante notare che vi è una sostanziale inerzia del TiO₂ nei confronti della radiazione visibile, tuttavia è apprezzabile una diminuzione statisticamente significativa, dopo 48h di irraggiamento, del colorante posto in miscela con l'addotto n-TiO₂@Avobenzone. Si è cercato di dare una spiegazione al fenomeno rifacendosi al principio di un classico DSSC (Dye Sensitized Solar Cell) ed alla somiglianza dell'Avobenzone con la curcumina⁵⁵.

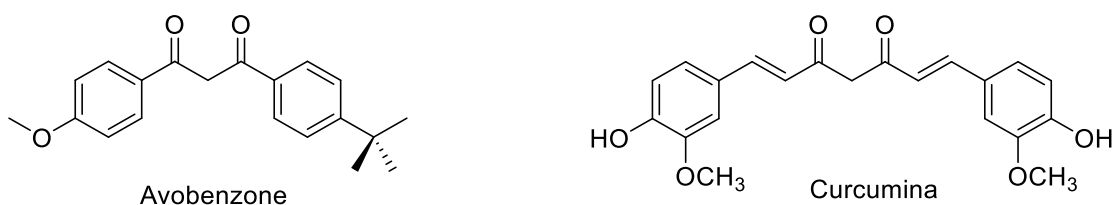


Figura 86. Struttura dell'avobenzene e della Curcumina a confronto. Entrambi si presentano come dichetoni soggetti a tautomeria cheto enolica

Facendo riferimento allo studio eseguito da Budee e collaboratori⁵⁵, si è ipotizzato che il band gap tra VB e CB del TiO₂ (3.20 eV) non fosse abbastanza poco energetico per permettere la promozione dell'elettrone e pertanto dare origine alle reazioni fotocatalitiche associati a questo transfer. Gli elettroni dell'Avobenzene, tuttavia, detenendo un buon assorbimento anche nel campo dell'UVA potrebbero, in seguito a radiazione nel visibile, subire il passaggio HOMO-LUMO. Dati sperimentali ottenuti da Trossini e collaboratori²⁴ mostrano un balzo energetico di 3.41 eV tra HOMO e LUMO per il cheto enolo E1 e 3.46 per il cheto enolo E2 (**Figura 87**), le quali sono le forme che risultano essere più abbondanti in seguito a coordinazione sul TiO₂ (sia considerando quanto riportato in letteratura per la curcumina, sia tenendo conto del fatto che la reazione è condotta in etanolo⁵⁶). Tuttavia tale balzo energetico avviene ad opera della radiazione a 363.83 nm, mentre il picco di assorbimento del TiO₂ Degussa associato al band gap di 3.20 eV è a lunghezza d'onda di 400 nm⁵⁷.

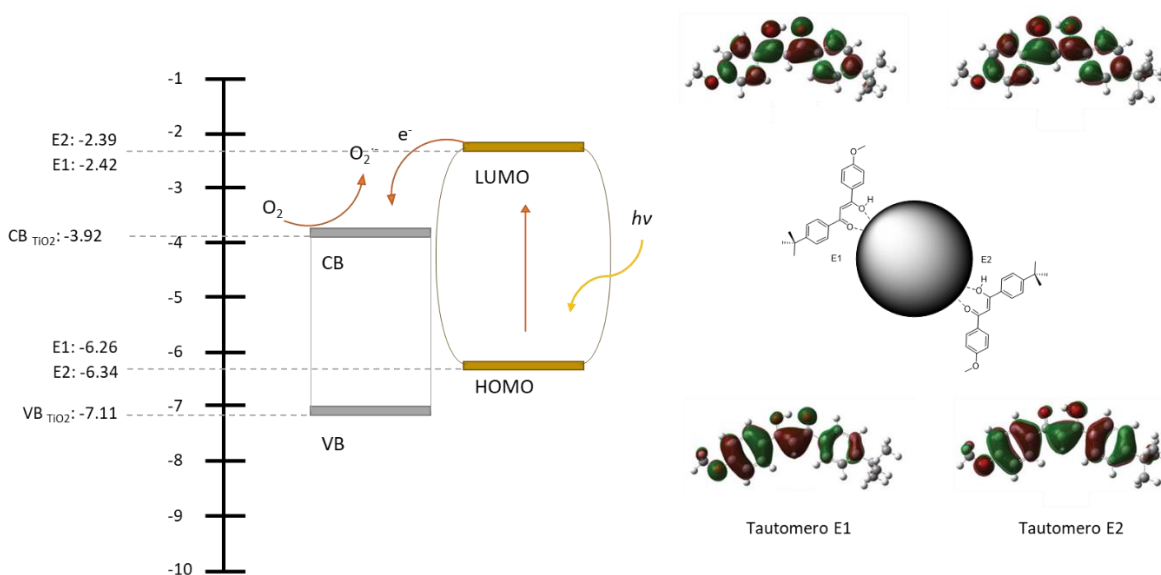


Figura 87. Ipotesi di meccanismo di funzionamento dell'addotto TiO₂@Avobenzene in seguito ad esposizione di radiazione luminosa. È evidente la presenza di un gap superiore per il passaggio da HOMO a LUMO nell'Avobenzene (3.41 eV) ed uno minore per il TiO₂ Degussa (3.20 eV).

Da tali evidenze risulterebbe difficile spiegare il fenomeno in questa chiave. Si è quindi proceduto eseguendo gli spettri UV-Vis del TiO₂ e dell'Avobenzene (**Figura 88**)

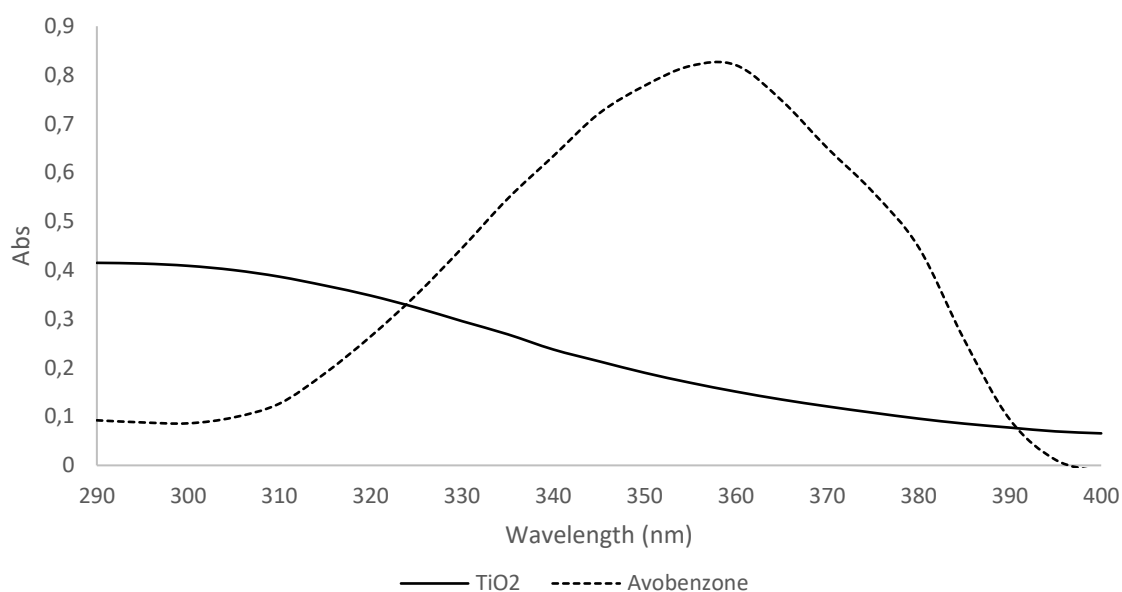


Figura 88: Spettri UV di TiO_2 ed Avobenzone. Le soluzioni $3.22 \cdot 10^{-4}$ per l'Avobenzone e $1.25 \cdot 10^{-2}$ per il TiO_2 riflettono la funzionalizzazione dell'addotto $\text{TiO}_2@$ Avobenzone.

Dagli spettri si nota una netta prevalenza dell'assorbanza relativa all'Avobenzone con il relativo picco spostato verso la regione del visibile. È quindi ipotizzabile che nella regione del visibile si abbia un minimo contributo derivante dall'assorbimento dell'Avobenzone che innesca le reazioni fotocatalitiche descritte in **Figura 87**.

Una conferma di tale meccanismo condurrebbe anche alla conclusione che sussiste un differente potere ossidante delle specie e^- ed h^+ che si creano nel semiconduttore: l'immissione degli elettroni nella banda di conduzione permette l'espressione delle reazioni fotoossidative del tipo:



Inibendo invece quelle destinate ad esprimersi nella banda di valenza



Il mantenimento di entrambe le reazioni tramite l'irraggiamento con radiazione UV ha condotto all'abbattimento quasi completo del colorante (**Tabella 60**, riga 5) con un passaggio da 81 a 7. Quando invece si è passati all'irraggiamento con radiazione Visibile solo la reazione 5.6.1 è rimasta attiva e la diminuzione della concentrazione di colorante è stata davvero debole pur con un tempo di esposizione notevolmente superiore (**Tabella 61**, riga 7) con passaggio da 90 a 72.

Ulteriori studi sono tuttavia necessari per meglio chiarire il meccanismo di azione.

5.7. n-ZnO @ Avobenzone

Caratterizzazione via FT-IR

La caratterizzazione dell'addotto tramite FT-IR è riportata in **Figura 89**

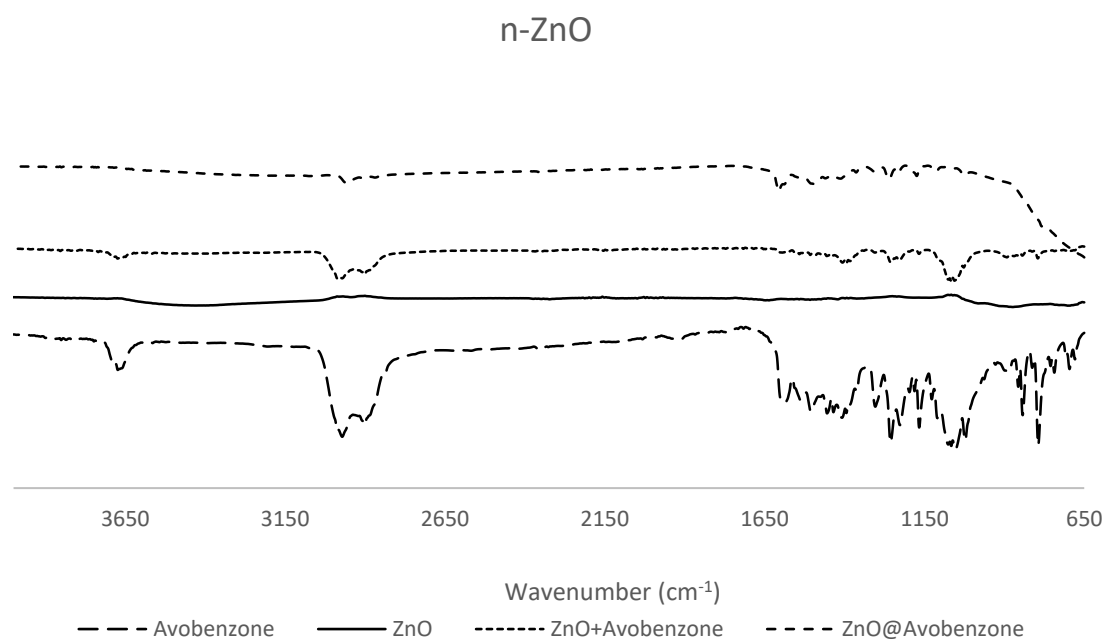


Figura 89. Spettro IR relativo all'addotto n-ZnO@Avobenzone.

Lo spettro FT-IR di ZnO nano mostra una banda larga dovuta all'umidità dell'acqua a 3500 e 1633 cm⁻¹ e l'assorbimento tipico di Zn-O inferiore a 600 cm⁻¹. Caratteristiche simili possono essere trovate nell'addotto n-ZnO@Avobenzone insieme a una serie di picchi attribuibili alla parte organica del composto.

La posizione dei picchi dell'addotto è differente da quelli dell'Avobenzone, questo potrebbe indicare la formazione di un legame chimico tra la molecola organica e l'ossido di Zinco.

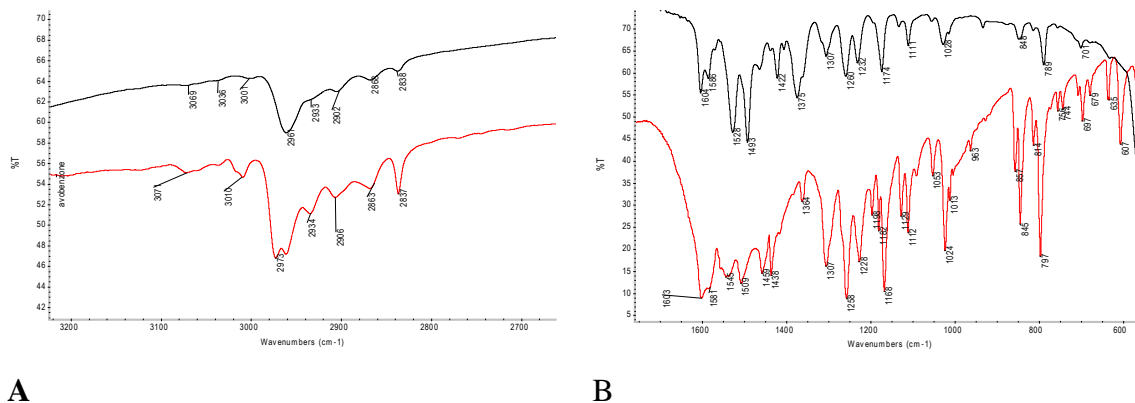


Figura 90. Focus sulle differenze tra picchi relativi all'Avobenzone puro (rosso) ed addotto (nero). A e B si differenziano dalle regioni indagate.

Dall'indagine più dettagliata dei picchi presentata in **Figura 90.B** è evidente una differenza sostanziale nei picchi a 1530, 1424, 1377 cm^{-1} , probabilmente riconducibile alla formazione di interazioni con lo Zn.

Analisi termogravimetrica (TGA)

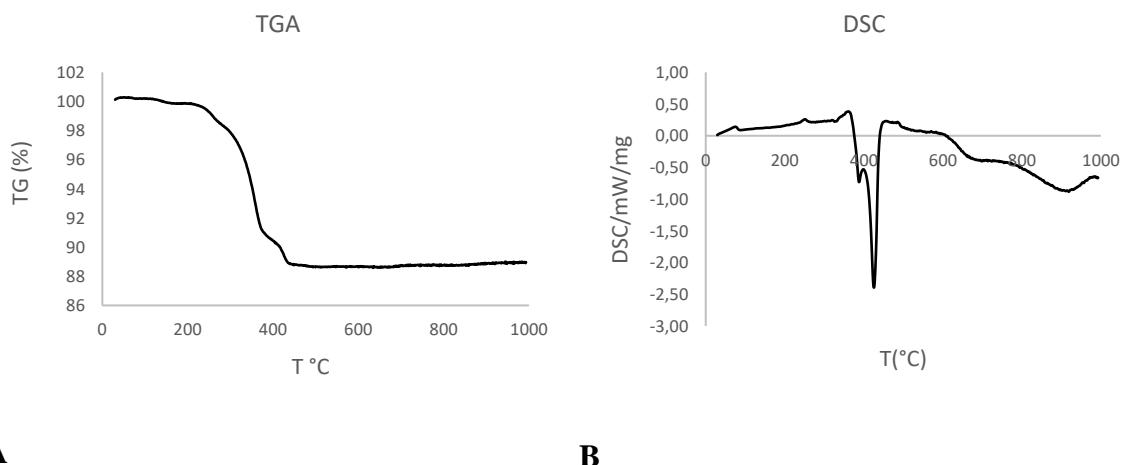


Figura 91. Analisi TGA e DLS relative all'addotto sintetizzato.

Come per il n-TiO₂@Avobenzone, anche in questo caso abbiamo un melting a 75°C poi un picco endotermico ma associato a perdita di 2% di massa, poi due perdite di massa maggiori fino ai 450°C.

Caratterizzazione colloidale (CSA, DLS-ELS, ζ , Velocità di Sedimentazione)

Di seguito sono riportati i dati di DLS, CSA e velocità di sedimentazione.

	DLS (nm) \pm SD	CSA (nm) \pm SD	Velocità di sedimentazione ($\mu\text{m/s}$) \pm SD
n-ZnO	167 \pm 34	162.6 \pm 1.2	33.91 \pm 0.3
n-ZnO@Avobenzone	81 \pm 3	76.9 \pm 2.8	120.5 \pm 13.3

Tabella 62. La prima e la seconda colonna mostrano i valori della dimensione delle particelle rilevati tramite DLS e CSA. L'ultima colonna mostra la velocità di sedimentazione.

La tabella dimostra una grande affinità tra i risultati ottenuti tramite DLS e CSA nella quale è evidenziata una forte diminuzione del particle size ad opera del rivestimento con Avobenzone. Lascia sorpresi il dato relativo alla velocità di sedimentazione: infatti ci si aspetterebbe una proporzionalità diretta tra diminuzione del diametro delle particelle e diminuzione della velocità di sedimentazione. È invece verificato il trend opposto che può trovare risposta grazie alla determinazione del potenziale Z (**Figura 92**).

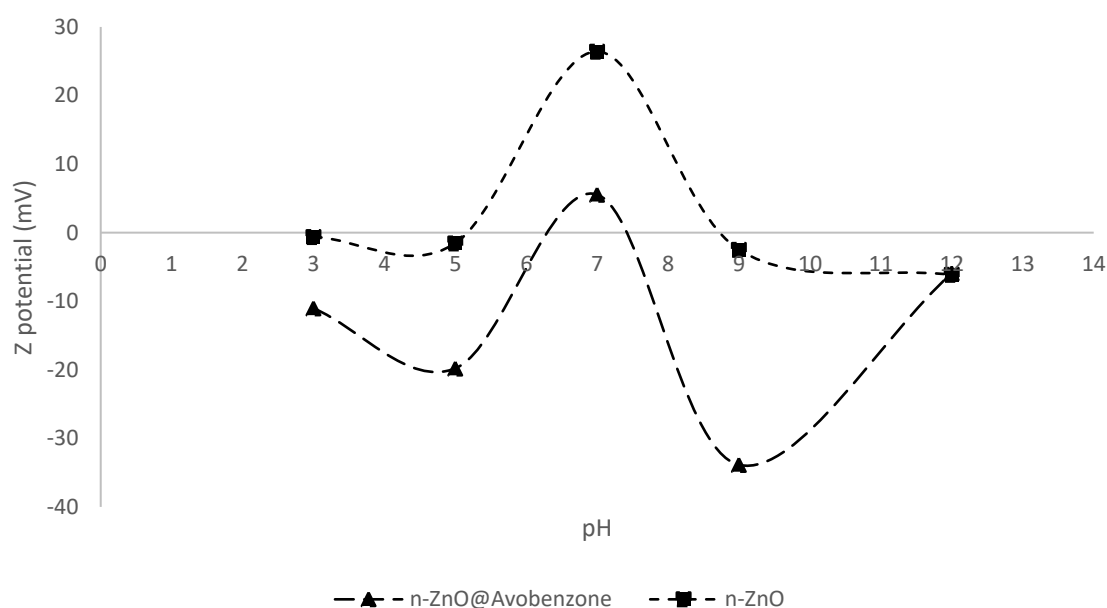


Figura 92. Andamento del potenziale Z al variare del pH

Il potenziale Z mostra un trend molto simile tra entrambe le specie, siano esse rivestite o non. Tuttavia è evidente uno shift a valori inferiori nel caso del rivestimento. Tale tendenza può efficacemente spiegare l'aumento della velocità di sedimentazione: infatti, mentre a pH 7 tale potenziale raggiunge il suo picco nel caso dello ZnO, nel caso del n-ZnO@Avobenzone il valore è nettamente diminuito. Essendo la velocità di sedimentazione misurata a pH prossimi alla neutralità, è plausibile un fenomeno di coalescenza che

incrementa considerevolmente la sedimentazione delle particelle quando queste sono rivestite.

Fotocatalisi

Di seguito i dati ottenuti riguardanti la determinazione dell'attività fotocatalitica:

Campione	Condizione	Concentrazione (mM) \pm SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	79.9 \pm 9.6
	<i>UV-Vis</i>	79.1 \pm 8.3
n-ZnO	<i>Dark</i>	67.5 \pm 7.1
	<i>UV-Vis</i>	27.2 \pm 3.6
n-ZnO@Avobenzone	<i>Dark</i>	79.6 \pm 8.5
	<i>UV-Vis</i>	76.6 \pm 8.1

Tabella 63. Andamento della concentrazione di colorante in seguito ad esposizione alla radiazione luminosa.

Anche in questo caso la presenza di un coating di Avobenzone aiuta notevolmente nella diminuzione dell'attività fotocatalitica dello ZnO. Come per l'addotto n-TiO₂@Avobenzone è stato condotto un ulteriore test prendendo in considerazione l'irraggiamento con la radiazione visibile. I dati sono riportati in tabella sottostante:

Campione	Condizione (48h)	Concentrazione (mM) \pm SD
Acid blue 9 solution	<i>Dark</i>	89.2 \pm 7.8
	<i>Vis</i>	90.5 \pm 9.9
n-ZnO	<i>Dark</i>	88.4 \pm 4.6
	<i>Vis</i>	87.6 \pm 6.3
n-ZnO@Avobenzone	<i>Dark</i>	88.7 \pm 5.1
	<i>Vis</i>	77.1 \pm 9.4

Tabella 64. Degradazione del colorante in seguito a 48h di esposizione alla radiazione visibile.

La diminuzione di concentrazione di colorante è osservata anche in questo esperimento nel caso dello ZnO rivestito. Come nel caso dell'ossido di titanio, anche qui è ipotizzabile un'immissione di elettroni nella banda di condizone in seguito ad irraggiamento con radiazione visibile.

6. Conclusioni

In questo periodo di dottorato si è indagato l'effetto di una funzionalizzazione su filtri fisici (ZnO e TiO₂) con Oxisol[®] e polifenoli ai fini di verificare un incremento del valore di SPF ed una diminuzione dell'effetto fotocatalitico. L'obiettivo è pertanto stato duplice: verifica dell'efficacia e della sicurezza delle nuove materie prime ottenute per l'applicazione cosmetica. I risultati sono stati estremamente positivi in entrambi i campi, tanto da portare alla stesura di un brevetto nazionale "PRODOTTO SOLARE COMPRENDENTE UN FILTRO FISICO" (riferimento n.102019000014076).

Lo studio concernente la valutazione dell'addotto ZnO@Oxisol[®] ha previsto dapprima lo sviluppo di un approccio sintetico per ottenere il coating, che ha portato in realtà ad una miscela nella quale coesistono le particelle di ZnO rivestite ed il complesso di Oxisol[®] con ioni Zn²⁺, come confermato dalle analisi ATR-FTIR, SEM e SEM-EDX. Un aspetto interessante riguarda il fatto che l'aggiunta di Oxisol[®] è stata favorita nel caso della forma non nanometrica di ZnO anziché della forma nanometrica e questo può essere spiegato da una larga distribuzione della popolazione particelle che varia da 10 nm a 1600 nm. Nonostante la coesistenza di coating e complesso, è comunque stato efficacemente raggiunto l'effetto booster amplificato auspicato, con valori di SPF incrementati di oltre il 100% per la forma nanometrica e di circa il 60% per la forma non nanometrica.

Nonostante la funzionalizzazione di SiO₂ abbia avuto esito positivo, la difficoltà di manipolazione del materiale ottenuto ci ha condotto ad escluderne l'impiego per i test successivi.

Il coinvolgimento dei gruppi idrossilici nella formazione del coating ha condotto ad una diminuzione sensibile dell'attività antiossidante dell'Oxisol[®], come dimostrato dalla PCL. Risultati estremamente positivi sono invece stati raggiunti nell'inibizione della fotocatalisi con un'importante inibizione e quindi un significativo aumento della sicurezza della materia prima.

La determinazione del potenziale Z ha mostrato una forte diminuzione a bassi valori di pH, questo a causa della solubilità delle particelle di ZnO in questa regione del pH. La finalità delle analisi colloidali condotte è stata quella di stabilire se la nuova materia prima potesse risultare migliore rispetto al semplice filtro non rivestito una volta posto in emulsione. La velocità di sedimentazione mostra valori nettamente diminuiti per il prodotto nella forma

non nanometrica e leggermente peggiorativo per quello nanometrico. Si può ipotizzare che il cristallo aghiforme riconducibile al complesso migliori la stabilizzazione della dispersione.

Lo studio di citotossicità ha offerto una valida interpretazione del comportamento dei filtri solari inorganici a contatto con i componenti biologici. I risultati più interessanti sono stati osservati nell'esperimento con concentrazione dell'analita a 10 µg/ml: infatti lo ZnO non funzionalizzato ha dimostrato una citotossicità superiore di dieci volte rispetto allo ZnO legato all'Oxiosol®. Dai test di solubilità ottenuti sembrerebbe che la tossicità sia direttamente proporzionale alla concentrazione di ioni Zn^{2+} presenti in soluzione.

Questi risultati portano indubbiamente numerosi vantaggi in ambito formulativo. La ridotta velocità di sedimentazione implica un aumento della stabilità del prodotto finito, inoltre una maggiore efficacia si traduce in un minor impiego di filtro, con conseguenti benefici economici ed ambientali.

Lo stesso approccio analitico è stato perpetrato anche per l'addotto $TiO_2@Oxisol$ ®. La funzionalizzazione ha portato ad un prodotto estremamente efficace: i valori di SPF si dimostrano superiori sia nella declinazione nanometrica che non, mentre la PCL evidenzia un apprezzabile mantenimento dell'attività antiossidante del legante. Il motivo potrebbe ricondursi ad una diminuzione dell'attività fotocatalitica oltre ad una conservazione del legante in seguito a legame covalente con l'ossido di titanio; il sistema $TiO_2@Oxisol$ ® potrebbe pertanto presentarsi come un "drug delivery system", incrementando notevolmente le potenzialità della materia prima.

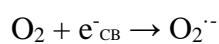
I dati di potenziale Z non hanno mostrato miglioramenti, infatti i valori si sono sempre dimostrati inferiori a $\pm 25mV$ in ciascun addotto esaminato. Nonostante il basso valore del potenziale Z, i risultati della velocità di sedimentazione sono notevolmente abbattuti, e questa evidenza suggerisce una stabilizzazione data dal contributo sterico.

Infine, la citotossicità mostra un'inerzia del biossido di titanio.

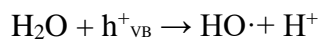
Possiamo concludere che il TiO_2 rivestito ottenuto con Oxisol® porta a numerosi vantaggi, come nel caso dello ZnO. In particolare, si è raggiunto un miglioramento della stabilizzazione ed un incremento dell'attività booster che consente di ridurre la quantità di filtri da utilizzare nella formulazione. L'attività fotocatalitica è stata significativamente limitata e l'analisi PCL ha dimostrato un mantenimento dell'attività antiossidante.

La funzionalizzazione di TiO₂ e ZnO con acido ellagico ed acido ferulico non ha condotto ad eclatanti aumenti di valore di SPF, tuttavia si è riscontrata anche in questo caso un'importante diminuzione dell'attività fotocatalitica e del diametro delle particelle, con conseguente miglioramento della sicurezza e della stabilità del prodotto finito. Anche la citotossicità ha subito miglioramenti nel caso degli addotti di ZnO, pur tuttavia mantenendosi attivo a concentrazioni di 100 µg/ml. Questa peculiarità ci ha spinti a verificare l'effetto antiacne degli addotti di ZnO@Oxisol® e ZnO@Acido Ferulico. Da tale analisi ne è scaturito un risultato decisamente interessante che ha sancito una forte attività dell'addotto nei confronti del *Propionibacterium acnes*.

Infine, sono stati vagliati gli addotti con Avobenzone. Tale funzionalizzazione ha portato ad un forte abbattimento della fotocatalisi e del diametro delle particelle, ma soprattutto, qualora i risultati ottenuti venissero confermati, ha permesso di fare chiarezza sul meccanismo di fotocatalisi. Infatti, l'esperimento condotto sia con radiazione UV che Visibile, ha dimostrato come il legante agisca da inibitore per il passaggio dell'elettrone dalla banda di valenza a quella di conduzione andando ad immettere direttamente lui stesso l'elettrone nella banda di conduzione. Essendo la reazione



meno attiva della reazione (riferimento)



ne consegue una netta diminuzione della capacità ossidante dell'addotto.

In conclusione si può affermare che da questo lavoro di dottorato è stata ottenuta una nuova generazione di filtri fisici in cui la molecola booster è stata direttamente legata al filtro fisico, portando ad un nuovo materiale con proprietà innovative, maggiore stabilità e capacità antiossidante, quest'ultima una proprietà completamente inedita per i filtri fisici.

Bibliografia

1. Gabros, S. & Zito, P. M. *Sunscreens And Photoprotection. StatPearls* (2018).
2. D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. & Scott, T. UV radiation and the skin. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 12222–12248 (2013).
3. Diffey, B. L. & Robson, J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **40**, 127–133 (1989).
4. Store I S O. INTERNATIONAL STANDARD Determination of sunscreen UVA. **2012**, (2012).
5. Gabros, S. & Zito, P. M. *Sunscreens And Photoprotection. StatPearls* (2018).
6. Cellano, L. *Dermatologia Cosmetologica.* (2008).
7. Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 298–308 (2004).
8. Lautenschlager, S., Wulf, H. C. & Pittelkow, M. R. Photoprotection. *Lancet* **370**, 528–537 (2007).
9. Cole, C., Shyr, T. & Ou-Yang, H. Metal oxide sunscreens protect skin by absorption, not by reflection or scattering. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **32**, 5–10 (2016).
10. Fujikake, K. *et al.* Problems of in vitro SPF measurements brought about by viscous fingering generated during sunscreen applications. *Skin Pharmacol. Physiol.* **27**, 254–262 (2014).
11. Bendová, H. *et al.* In vitro approaches to evaluation of Sun Protection Factor. *Toxicol. Vitr.* **21**, 1268–1275 (2007).
12. Care, H., Reviews, C., Ap, F. & Rafaela, N. Health Care: Current Reviews Determination of Sun Protection Factor by UV-Vis Spectrophotometry. **1**, 1–4 (2013).
13. Padera, F. Sunscreen testing according to COLIPA 2011/ FDA final rule 2011 using UV/Vis LAMBDA spectrophotometers. *PerkinElmer, Inc.* 1–9 (2011).

14. Vertuani, S. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel hydroxy-phenyl-1H-benzimidazoles as radical scavengers and UV-protective agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 527–537 (2017).
15. Mckinnon, C. M. Short communication Effect of wheat variety , farming site , and bread-baking on total phenolics. 329–332 (2006) doi:10.1111/j.1365-2621.2005.01057.x.
16. Mateo, N., Berg, R. Van Den, Havenaar, R., Bast, A. & Haenen, G. R. M. M. Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *J. Cereal Sci.* **49**, 296–300 (2009).
17. Lin, F. *et al.* Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 826–832 (2005).
18. Narayanan, B. A., Geoffroy, O., Willingham, M. C., Re, G. G. & Nixon, D. W. p53 / p21 (WAF1 / CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. **136**, 215–221 (1999).
19. Dianat, M. *et al.* Ellagic Acid Protects Cardiac Arrhythmias Following Global Cerebral Ischemia/Reperfusion Model. *Galen Med. J.* (2019) doi:10.31661/gmj.v0i0.1235.
20. Biology, C. ELLAGIC ACID TOXICITY AND INTERACTION WITH BENZO [A] PYRENE AND BENZO [A] PYRENE 7 , 8-DIHYDRODIOL IN HUMAN BRONCHIAL. **2**, 53–62 (1986).
21. Vielhaber, G., Grether-beck, S., Koch, O. & Krutmann, J. Sunscreens with an absorption maximum of ≥ 360 nm provide optimal protection against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinase-1 , interleukin-1 , and interleukin-6 in human dermal fibroblasts. 275–282 (2006) doi:10.1039/b516702g.
22. Trullas, C. *et al.* A Blocked Diketo Form of Avobenzone : Photostability , Photosensitizing Properties and Triplet Quenching by a Triazine-derived UVB-filter. 178–184 (2009) doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00414.x.
23. Chatelain, E. & Gabard, B. Photostabilization of Butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and Ethylhexyl methoxycinnamate by Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a New UV Broadband Filter ¶. **74**, 401–406

- (2001).
24. Trossini, G. H. G. *et al.* Theoretical study of tautomers and photoisomers of avobenzene by DFT methods. *J. Mol. Model.* **21**, 1–7 (2015).
 25. Tobaldi, D. M. (University of B. Materiali ceramici per edilizia con funzionalità fotocatalitica. *Ph.D. Thesis* (2009).
 26. Jin, C., Zhu, B., Wang, X. & Lu, Q. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibr.pdf. 1871–1877 (2008).
 27. Zeininger, L., Portilla, L., Halik, M. & Hirsch, A. Quantitative Determination and Comparison of the Surface Binding of Phosphonic Acid, Carboxylic Acid, and Catechol Ligands on TiO₂Nanoparticles. *Chem. - A Eur. J.* **22**, 13506–13512 (2016).
 28. Singh, B., Srivastava, R. & Narang, K. K. Synthesis and spectral studies of zinc chloride complexes with some acetophenone and 4-hydroxy-acetophenone acylhydrazones. *Synth. React. Inorg. Met. Chem.* **30**, 1175–1192 (2000).
 29. Yuan, L. *et al.* Studies on the preparation and photostability of avobenzene and (2-hydroxy)propyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **369**, 174–180 (2019).
 30. Brunelli, A. *et al.* Effects of organic modifiers on the colloidal stability of TiO₂nanoparticles. A methodological approach for NPs categorization by multivariate statistical analysis. *NanoImpact* **9**, 114–123 (2018).
 31. Detloff, T., Sobisch, T. & Lerche, D. Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems). *Powder Technol.* **174**, 50–55 (2007).
 32. Wang, D. *et al.* Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? *J. Hazard. Mater.* **308**, 328–334 (2016).
 33. Badetti, E. *et al.* Interaction between Copper Oxide Nanoparticles and Amino Acids : Influence on the Antibacterial Activity. (2019).
 34. Schmidt-Ott, A., van den Berg, K. J., Dik, J., Kooyman, P. J. & van Driel, B. A. A quick assessment of the photocatalytic activity of TiO₂ pigments — From lab to conservation studio! *Microchem. J.* **126**, 162–171 (2015).

35. Bukallah, S. B., Rauf, M. A. & Ashraf, S. S. Photocatalytic decoloration of Coomassie Brilliant Blue with titanium oxide. *Dye. Pigment.* **72**, 353–356 (2007).
36. Liu, Y., Hua, L. & Li, S. Photocatalytic degradation of Reactive Brilliant Blue KN-R by TiO₂/UV process. *Desalination* **258**, 48–53 (2010).
37. Baldisserotto, A. *et al.* Moringa oleifera leaf extracts as multifunctional ingredients for “natural and organic” sunscreens and photoprotective preparations. *Molecules* **23**, (2018).
38. Dimitrovska Cvetkovska, A. *et al.* Factors affecting SPF in vitro measurement and correlation with in vivo results. *Int. J. Cosmet. Sci.* **39**, 310–319 (2017).
39. Lin, W. *et al.* A general approach to study the thermodynamics of ligand adsorption to colloidal surfaces demonstrated by means of catechols binding to zinc oxide quantum dots. *Chem. Mater.* **27**, 358–369 (2015).
40. Rangan, S., Theisen, J. P., Bersch, E. & Bartynski, R. A. Energy level alignment of catechol molecular orbitals on ZnO(1 1 over(2), 0) and TiO₂(1 1 0) surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 4829–4833 (2010).
41. Azuma, M. *et al.* Photocatalysis of titanium dioxide modified by catechol-type interfacial surface complexes (ISC) with different substituted groups. *J. Catal.* **329**, 286–290 (2015).
42. Lenz, A. *et al.* ZnO nanoparticles functionalized with organic acids: An experimental and quantum-chemical study. *J. Phys. Chem. C* **113**, 17332–17341 (2009).
43. Dudev, T. & Lim, C. Tetrahedral vs octahedral zinc complexes with ligands of biological interest: A DFT/CDM study. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 11146–11153 (2000).
44. Jiang, C., Aiken, G. R. & Hsu-Kim, H. Effects of Natural Organic Matter Properties on the Dissolution Kinetics of Zinc Oxide Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 11476–11484 (2015).
45. Fatehah, M. O., Aziz, H. A. & Stoll, S. Stability of ZnO Nanoparticles in Solution. Influence of pH, Dissolution, Aggregation and Disaggregation Effects. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **3**, 75–84 (2014).
46. Mohd Omar, F., Abdul Aziz, H. & Stoll, S. Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *Sci.*

- Total Environ.* **468–469**, 195–201 (2013).
47. Sharma, V. *et al.* DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. Lett.* **185**, 211–218 (2009).
 48. George, S. *et al.* Use of a rapid cytotoxicity screening approach to engineer a safer zinc oxide nanoparticle through iron doping. *ACS Nano* **4**, 15–29 (2010).
 49. Misra, S. K., Dybowska, A., Berhanu, D., Luoma, S. N. & Valsami-Jones, E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Sci. Total Environ.* **438**, 225–232 (2012).
 50. Srivastav, A. K. *et al.* Impact of Surface-Engineered ZnO Nanoparticles on Protein Corona Configuration and Their Interactions With Biological System. *J. Pharm. Sci.* **108**, 1872–1889 (2019).
 51. Copur, M. Optimization of dissolution of Zn and Cd metals from Waelz sintering waste by in aqueous (NH NH_4) SO_4 solution. *Energy Educ. Sci. Technol. Part A Energy Sci. Res.* **25**, (2010).
 52. Parisi, O. I. *et al.* Mesoporous nanocrystalline TiO₂ loaded with ferulic acid for sunscreen and photo-protection: Safety and efficacy assessment. *RSC Adv.* **6**, 83767–83775 (2016).
 53. Brezová, V., Blažková, A., Šurina, I. & Havlínová, B. Solvent effect on the photocatalytic reduction of 4-nitrophenol in titanium dioxide suspensions. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **107**, 233–237 (1997).
 54. Kalinowska, M. *et al.* Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H, ¹³C NMR, UV/VIS), thermogravimetric and antimicrobial studies of Ca(II), Mn(II), Cu(II), Zn(II) and Cd(II) complexes of ferulic acid. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **122**, 631–638 (2014).
 55. Buddee, S., Wongnawa, S., Sriprang, P. & Sriwong, C. Curcumin-sensitized TiO₂ for enhanced photodegradation of dyes under visible light. *J. Nanoparticle Res.* **16**, (2014).
 56. Vallejo, J. J., Gallardo, C. & Mesa, M. Evaluation of the avobenzone photostability in solvents used in cosmetic formulations. *Vitae* **18**, 63–71 (2011).
 57. Guayaquil-Sosa, J. F., Serrano-Rosales, B., Valadés-Pelayo, P. J. & de Lasa, H.

Photocatalytic hydrogen production using mesoporous TiO₂ doped with Pt. *Appl. Catal. B Environ.* **211**, 337–348 (2017).