



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE**

Corso di laurea magistrale in  
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

**DETERMINAZIONE DEL POTENZIALE FOTOPROTETTIVO DI ESTRATTI  
DALLA PIANTA *CYCLOPIA SPP.* (HONEYBUSH)**

**DETERMINATION OF THE PHOTOPROTECTIVE POTENTIAL OF EXTRACTS  
FROM THE PLANT *CYCLOPIA SPP.* (HONEYBUSH)**

Tesi di Laurea Magistrale di:  
Alessia Luccarini

Relatore Chiar.mo Prof.  
Prof.ssa Elisabetta Damiani

Correlatore:  
Prof. Luca Tiano  
Dott. Fabio Marcheggiani

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2021/2022

## Indice

<b>INTRODUZIONE E SCOPO</b> .....	4
<b>CAPITOLO 1: LA LUCE</b> .....	7
1.1 <i>La radiazione solare</i> .....	7
1.2 <i>Le radiazioni ultraviolette</i> .....	10
<b>CAPITOLO 2: CONSEGUENZE A CARICO DELLA PELLE INDOTTE DAI RAGGI UV</b> .....	12
2.1 <i>La struttura della pelle</i> .....	12
2.2 <i>Effetti positivi delle radiazioni UV</i> .....	14
2.3 <i>Effetti negativi delle radiazioni UV</i> .....	17
2.3.1 <i>I danni indotti al DNA</i> .....	20
2.3.2 <i>I danni a carico dei lipidi</i> .....	22
2.3.3 <i>I danni a carico delle proteine</i> .....	25
<b>CAPITOLO 3: LO STRESS OSSIDATIVO</b> .....	27
3.1 <i>Le specie reattive dell'ossigeno</i> .....	27
3.2 <i>Stress ossidativo</i> .....	32
<b>CAPITOLO 4: I FILTRI SOLARI</b> .....	34
4.1 <i>I filtri solari come mezzi di protezione dalla radiazione solare</i> .....	34
4.2 <i>Filtri chimici e filtri fisici: Le differenze tra loro</i> .....	35
4.3 <i>Caratteristiche ideali di un filtro solare</i> .....	44
4.4 <i>Regolamentazione dei filtri solari</i> .....	50
4.5 <i>Composizione di una crema solare</i> .....	54
4.6 <i>Effetti dannosi e tossici di alcuni filtri solari</i> .....	56
<b>CAPITOLO 5: NUOVE SOLUZIONI ALTERNATIVE A SALVAGUARDIA DELLA SALUTE E DELL'AMBIENTE</b> .....	65
5.1 <i>L'Honeybush</i> .....	66
<b>CAPITOLO 6</b> .....	
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	74
6.1 <i>Estratti provenienti da Cyclopia genistoides</i> .....	74
6.2 <i>Determinazione degli spettri di assorbanza dei diversi estratti</i> .....	75

6.3 Fotostabilità dei diversi estratti dopo esposizione ad UVA.....	77
6.4 Saggi per la determinazione del danno fotoindotto su macromolecole biologiche.....	78
6.4.1 Preparazione dei Liposomi.....	78
6.4.2 Preparazione dei Campioni.....	79
6.4.3 Irraggiamento UVA.....	80
6.5 Saggio per la Perossidazione Lipidica (TBARS).....	81
6.5.1 Incorporazione degli estratti nei liposomi.....	83
6.6 Saggio di ossidazione proteica.....	84
6.7 Valutazioni dell'effetto fotoprotettivo su colture cellulari.....	86
6.7.1 Saggio del MitoSox RED tramite citofluorimetria a flusso.....	87
<b>CAPITOLO 7</b> .....	
<b>RISULTATI</b> .....	91
7.1 Analisi degli spettri di assorbanza.....	91
7.2 Analisi fotostabilità degli estratti.....	96
7.3 Effetto fotoprotettivo su macromolecole biologiche: I lipidi.....	99
7.4 Effetto protettivo su macromolecole biologiche: Le proteine.....	103
7.5 Effetto fotoprotettivo a livello mitocondriale in fibroblasti di derma umano.....	106
<b>CAPITOLO 8:</b> .....	
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONE</b> .....	109
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	112
<b>SITOGRAFIA</b> .....	125

## INTRODUZIONE E SCOPO

E' oramai ben noto che una sovraesposizione alle radiazioni ultraviolette (UVR), capaci di raggiungere la superficie terrestre, possono portare a conseguenze dannose alla pelle, come eritema, edema, fotoinvecchiamento e cancro della pelle accelerando così la necessità di proteggere la pelle umana dagli effetti dannosi degli UV. Mentre i raggi UVC (<280 nm) vengono quasi completamente assorbiti dallo strato di ozono dell'atmosfera, gli UVA (320-400 nm) rappresentano più del 90% della radiazione UV totale che colpisce la terra; sono in grado di originare un danno ossidativo alle strutture cellulari tramite la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono causare modificazioni ossidative del DNA o di altre macromolecole come proteine e lipidi, alterando profondamente le funzioni cellulari oltre ad agire da iniziatori nella fotogenesi nel cancro della pelle (Narayanan, 2010).

Tra le diverse misure di difesa adottate per diminuire i danni indotti alla pelle dalla sovraesposizione ai raggi solari, quella più comune è l'uso di creme solari, che grazie alla presenza di filtri solari, di origine sintetica, sia organici che inorganici, sono in grado di proteggerla durante l'esposizione. Tuttavia, alcuni filtri solari comunemente usati nelle creme, hanno dimostrato avere diverse problematiche e di dar luogo a conseguenze negative riscontrabili sia a livello ambientale che per la salute umana.

Sempre più studi confermano infatti, che alcune sostanze presenti nelle normali creme solari, permangono nel corpo per oltre 24 ore dopo l'applicazione e vengono assorbite, destando quindi preoccupazione alla luce dei numerosi effetti tossici ad essi attribuiti, sia locali (come irritazioni, allergie) che sistemici (come l'interferenza con il sistema ormonale e gli effetti mutageni) (Giokas, 2007) (Suh, 2020).

L'ossibenzone (o benzofenone-3), ad esempio, un derivato del benzofenone, è uno dei filtri UVA/B più utilizzati nelle creme solari e nonostante le sue qualità fotoprotettive, è sempre più indagato per il possibile impatto negativo sulla salute: agisce da interferente endocrino, capace quindi di alterare il normale funzionamento degli ormoni (Wnuk, 2022). È considerato anche un contaminante marino perché

rappresenta una minaccia per coralli e altri organismi marini. Infatti, questo filtro, come diversi altri, provoca il fenomeno detto “sbiancamento dei coralli”, che porta a gravi alterazioni per tutto l’ecosistema marino (Du, 2017).

Tutte queste evidenze hanno fatto sì che l’esigenza del consumatore cambiasse, imponendo quindi ai brand di trovare soluzioni alternative ed eco-friendly certificati come “reef-safe”, ad indicare l’attenzione verso l’ambiente.

Si sta cercando, sempre di più, per ridurre la quantità di filtri sintetici, di utilizzare composti naturali, che oltre ad avere la proprietà di assorbire i raggi UV, sono anche dotati di attività antiossidante ed antinfiammatoria.

L’Honeybush (*Cyclopia spp.*) è una pianta endemica del Sudafrica appartenente alla famiglia delle leguminose, che viene utilizzata come bevanda per le sue molteplici proprietà, quali la mancanza di caffeina, il contenuto di tannini molto basso, la capacità di diminuire i livelli di glucosio e l’alto contenuto di polifenoli (Kokotkiewicz, 2009). Il profilo fenolico varia qualitativamente e quantitativamente a seconda della specie considerata, però i principali costituenti appartengono alle sottoclassi di xantoni, benzofenone, flavanoni, flavoni e diidrocalconi. Gli estratti di Honeybush hanno dimostrato, a causa della loro composizione fenolica, di possedere attività antiossidanti che sono di grande importanza nella ricerca delle malattie legate allo stress ossidativo.

Lo scopo dello studio è quindi rivolto a caratterizzare l’eventuale azione fotoprotettiva dei polifenoli di questa pianta, in particolare dei benzofenoni, come filtri UV naturali, destinati a contrastare gli effetti dannosi a lungo termine della sovraesposizione ai raggi UV sulla pelle.

Lo studio vuole dimostrare come anche degli estratti naturali, come quelli appartenenti a questa pianta, ma anche di altre, riescano a proteggere dal danno ossidativo indotto dai raggi UVA, confrontandoli anche con filtri organici sintetici come il BMDBM (butil metossidibenzoilmetano) e il BP-3 (benzofenone-3).

L’interesse verso questo campo si sta diffondendo sempre di più, inquanto molti sono i brand che cercano soluzioni alternative, a riprova del fatto che i composti presenti in natura, opportunamente utilizzati, come quelli ottenuti dall’Honeybush,

potrebbero essere presi in considerazione per diventare dei validi sostituti, sebbene in maniera parziale, dei filtri sintetici presenti nelle creme solari.

# CAPITOLO 1

## LA LUCE

### 1.1 La radiazione solare

La radiazione solare è essenziale per la vita nel nostro pianeta, senza la quale non sarebbe possibile alcuna forma di esistenza. La fotosintesi clorofilliana consente agli organismi del regno vegetale di generare energia raccogliendo fotoni nell'intervallo visibile, e i cromofori all'interno delle cellule viventi assorbono la luce visibile, la convertono in energia termica e aiutano a mantenere la temperatura entro limiti che favoriscono lo sviluppo delle forme vita. (Giacomoni, 2020).

Il sole svolge i suoi effetti su di noi con l'irraggiamento, emettendo cioè energia sottoforma di fotoni, che noi chiamiamo comunemente luce. Quando quest'ultima ci colpisce, i suoi effetti dipendono dalla lunghezza d'onda, che viene misurata in nanometri (nm). La radiazione solare (figura 1) si estende su tutto lo spettro elettromagnetico, dai raggi  $\gamma$  ai raggi x, attraverso l'ultravioletto (UV), il visibile e l'infrarosso, fino alle microonde e radioonde.

Tuttavia, la parte più significativa dello spettro, per quanto riguarda il trasferimento radiativo di energia nel sistema clima, è compreso tra l'ultravioletto e il vicino infrarosso (Davolio, 2012).

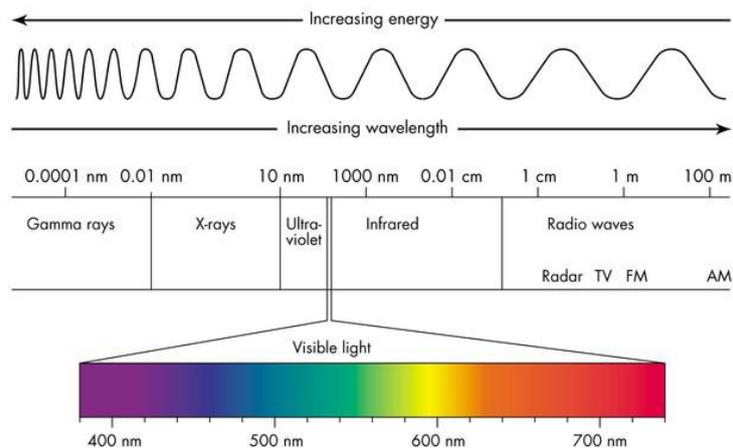


Figura 1: Spettro della radiazione elettromagnetica

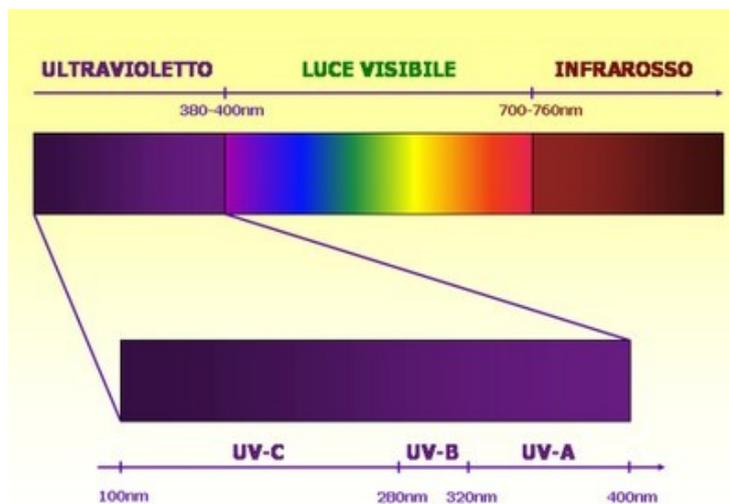
Le radiazioni solari (figura 2) possono essere visibili o non visibili. Quella visibile raggiunge gli strati più esterni della superficie terrestre e corrisponde al 41% della radiazione globale emessa dal sole; a seconda della lunghezza d'onda, si dividono in:

- Blu-violette (400-490 nm): sono utili per il processo di fotosintesi clorofilliana perché vengono assorbite dalla clorofilla;
- Verdi (490-560 nm): sono quelle meno importanti per la fotosintesi;
- Rosso-arancio (590-700 nm): sono fondamentali per la fotosintesi clorofilliana ed il colore verde delle piante è dovuto proprio a queste (Informazione Ambiente,2021)

La radiazione non visibile è costituita da:

- Raggi ultravioletti (UVR)
- Infrarossi.

I raggi ultravioletti (UVR) hanno una lunghezza d'onda inferiore ai 400 nm, quelli dei raggi infrarossi (IR) sono superiori ai 700 nm.



*Figura 2: Dettaglio radiazione nella zona dell'ultravioletto*

La radiazione solare che raggiunge la terra è composta dal 6.8% di UVR, dal 38.9% di luce visibile e dal 54.3% di IR (Barolet, 2016).

La quantità di energia contenuta nella radiazione solare è inversamente proporzionale alla sua lunghezza d'onda: radiazioni ad alta frequenza, quindi a

bassa lunghezza d'onda, hanno un maggiore contenuto energetico e di conseguenza, quando giungono a contatto diretto con la pelle, sono responsabili di un danno maggiore.

Gli effetti della luce sull'organismo sono variabili, così come diversa è la modalità di assorbimento.

La luce visibile è molto importante per la regolazione di alcune attività corporee come il ciclo sonno-sveglia, l'andamento circadiano degli ormoni e la stimolazione della produzione della serotonina, un importante neurotrasmettitore. Negli ultimi anni è stato segnalato che la luce blu (radiazione elettromagnetica dello spettro della luce visibile) ha effetti benefici e dannosi sulla pelle; è utile, ad esempio, per il trattamento di malattie della pelle come acne, psoriasi e dermatite atopica, ha effetti antimicrobici e antinfiammatori (Garza,2018). Tuttavia, la luce blu può danneggiare la pelle penetrando in profondità nello strato dermico, danneggiare i mitocondri e produrre ROS, con conseguente invecchiamento della pelle. È stato visto che può anche causare effetti indiretti sul corpo umano, interrompendo il normale ritmo circadiano, il che può influenzare negativamente i processi di riparazione cutanea (Suihthimeathegorn, 2022).

I raggi infrarossi determinano soprattutto effetti termici e sono in gran parte assorbiti dall'atmosfera. La loro caratteristica più importante è la trasmissione di calore allo strato superficiale della pelle (strato corneo), pertanto un eccessivo assorbimento può danneggiare la cute provocando ipertermia e sintomi che vanno dalla vasodilatazione alla disidratazione cutanea.

La radiazione infrarossa penetra negli strati epidermici e dermici della pelle e raggiunge una profondità maggiore dei raggi UV; di conseguenza può causare danni sia all'epidermide che al derma; in relazione a ciò il collagene può essere danneggiato dall'effetto della radiazione IR (infrarossa) che causa una sovraespressione delle metalloproteasi della matrice (MMP). I cambiamenti nella struttura o nell'organizzazione del collagene sono responsabili di alterazioni della morfologia cutanea, come scolorimento, perdita di elasticità, rughe o compromissione della funzione barriera (Fernandez, 2016).

Le radiazioni ultraviolette possono determinare effetti sia positivi che negativi: infatti concorrono nella sintesi della vitamina D, sostanza necessaria allo sviluppo scheletrico in grado di proteggere le ossa da diverse patologie. Una carenza di vitamina D, causata anche da insufficiente esposizione al sole, impedendo il corretto assorbimento di calcio e fosforo da parte dell'intestino, comporta la conseguente riduzione della mineralizzazione ossea. Gli effetti benefici della luce solare sui livelli di vitamina D portano quindi vantaggi a chi soffre di patologie dello scheletro come osteoporosi, rachitismo, artrosi e reumatismi. I raggi UV vengono inoltre utilizzati nella cura di patologie come psoriasi e dermatite atopica (Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, 2022). Tra i possibili effetti negativi, vi sono eritemi solari da eccessiva e/o incongrua esposizione, macchie cutanee, invecchiamento cutaneo (caratterizzato da rughe, solchi, cute anelastica), ma soprattutto patologie cutanee di tipo oncologico (Flament, 2013).

## **1.2 Le radiazioni ultraviolette**

Circa il 95% della radiazione solare sulla superficie terrestre è composta da lunghezze d'onda IR e visibile, rispettivamente a circa il 45% e il 50%; mentre i raggi UV rappresentano circa il 5% con lunghezze d'onda comprese tra 290 e 400 nm. Queste lunghezze d'onda (figura 3), sono suddivise in:

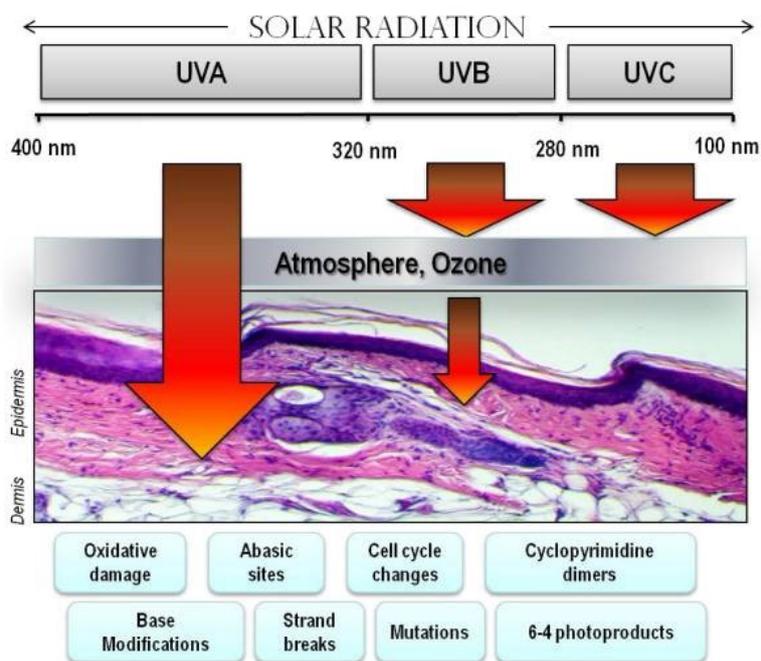
- UVA-1 (400–340 nm), UVA-2 (340–315 nm)
- UVB (315–290 nm)
- UVC (190-290 nm)

Gli UVA costituiscono circa il 95% degli UV che raggiungono il suolo, la restante parte è rappresentata dagli UVB e questo dipende da fattori quali latitudine, stagione, nuvolosità e ora del giorno (Young, 2006). Grazie alla presenza dell'ozono atmosferico giungono sulla superficie terrestre soltanto i raggi UV meno energetici (quelli meno pericolosi per la salute umana). Infatti, l'ozono atmosferico svolge una funzione di "filtro naturale"; ha la proprietà di bloccare varie radiazioni (nocive per gli esseri viventi) con una banda di assorbimento molto forte tra 200 e 310 nm (banda di Halery) e una più debole tra 310 e 350 nm (banda di Huggins). In particolare, vengono bloccati gli UVC, raggi ultravioletti corti ad alta energia, e le

radiazioni a cortissima lunghezza d'onda (raggi X, raggi  $\gamma$  e raggi cosmici), le quali se non schermate, renderebbero impossibile qualsiasi forma di vita animale a causa della loro capacità di penetrare profondamente i tessuti (Dickinson, 2003).

Queste radiazioni sono riconosciute come potenti cancerogeni, a causa del danno ossidativo indotto dalla produzione di radicali liberi. Provocano una varietà di lesioni nel DNA, comprese rotture a singolo e doppio filamento, che potrebbero non essere correttamente riparate, in quanto le radiazioni possono alterare il modello di espressione genica coinvolto normalmente in questo processo (Sudprasert, 2006).

Dalla metà degli anni '80, gli scienziati hanno iniziato a temere che lo strato di ozono si stesse esaurendo. Il motivo dell'assottigliamento dell'ozono stratosferico è dovuto al rilascio nell'atmosfera di alcune sostanze chimiche dannose per l'ozono (clorofluorocarburi) che vengono rilasciate dall'industria e dai gas di scarico degli autoveicoli. L'esaurimento dello strato di ozono provoca un aumento dei raggi UVR, (soprattutto UVB, che sono i raggi UV più cancerogeni), che raggiungono la superficie terrestre (Deevya, 2010).



*Figura 3: Rappresentazione schematica delle radiazioni ultraviolette e delle modificazioni indotte*

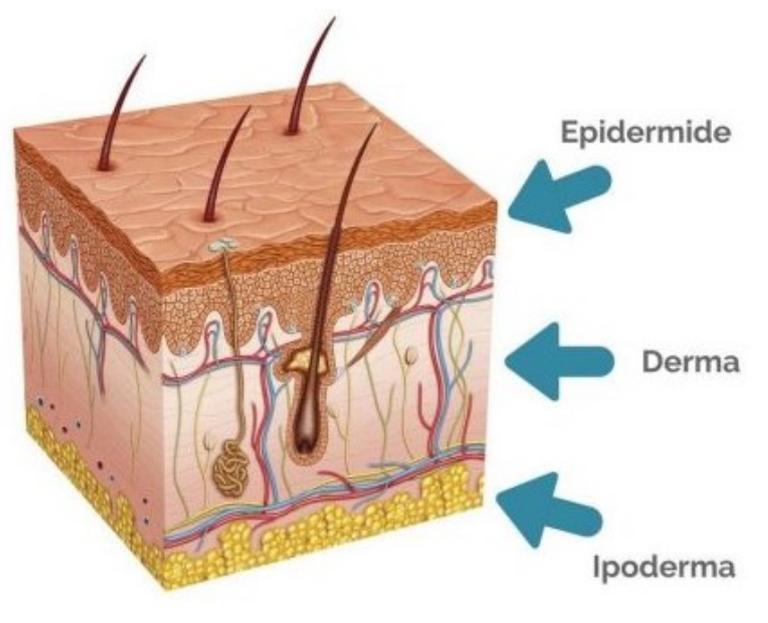
## CAPITOLO 2

### CONSEGUENZE A CARICO DELLA PELLE INDOTTE DAI RAGGI UV

#### 2.1 La struttura della pelle

I raggi UV contribuiscono all'insorgere di una varietà di malattie della pelle, tra cui infiammazioni, invecchiamento degenerativo e cancro.

La pelle è organizzata in tre strati primari: epidermide, derma e ipoderma (figura 4) che insieme sono costituiti da componenti epiteliali, mesenchimali, ghiandolari e neurovascolari.



*Figura 4: Stratificazione della pelle*

**L'epidermide**, di origine ectodermica, è lo strato più esterno e funge da punto di contatto del corpo con l'ambiente. In quanto tali, le caratteristiche biologiche e fisiche dell'epidermide svolgono un ruolo enorme nella resistenza a fattori di stress ambientali come agenti patogeni infettivi, agenti chimici e raggi UV. I cheratinociti sono le cellule più abbondanti nell'epidermide e sono caratterizzati dalla loro espressione di citocheratine e formazione di desmosomi e giunzioni strette tra loro

per formare un'efficace barriera fisico-chimica. Oltre a creare una barriera fisica altamente efficace, i cheratinociti accumulano anche pigmenti di melanina mentre maturano, la quale agisce bloccando la penetrazione dei raggi UV nella pelle. La sintesi della melanina è limitata ai melanociti, presenti sia nel derma che nell'epidermide. La melanina può avere molti altri importanti effetti fisiologici, comprese le influenze regolatorie sull'omeostasi epidermica, lo scavenging dei radicali liberi per proteggere dal danno ossidativo ed è forse anche dotata di attività antimicrobica (d'Orazio, 2013).

I cheratinociti epidermici nascenti formati a seguito della divisione cellulare da parte delle cellule staminali dei cheratinociti nello strato basale subiscono una differenziazione programmata mentre migrano verso l'esterno verso la superficie della pelle per formare alla fine i corneociti, che sono cellule morte ma intatte strettamente collegate che costituiscono il principio barriera dello strato epidermico più esterno.

**Il derma**, derivato dal mesoderma, è alla base dell'epidermide e ospita strutture cutanee, tra cui follicoli piliferi, nervi, ghiandole sebacee e ghiandole sudoripare. Il derma contiene anche abbondanti cellule immunitarie e fibroblasti, che partecipano attivamente a molte risposte fisiologiche della pelle. È costituito da tessuto connettivo fibroso composto da una matrice extracellulare di fibre collagene, di fibre elastiche e fibre reticolari immerse in una sostanza fondamentale ricca di proteoglicani e di altre macromolecole, che si legano con facilità all'acqua e conferiscono al derma una consistenza gelatinosa. Oltre alla componente extracellulare è presente una componente cellulare di cui i fibroblasti, cellule di forma allungata che sintetizzano le fibre, sono i principali elementi (Liem, 2006).

I fasci di fibre collagene sono le fibre più abbondanti tra quelle del derma e sono costituite dalla proteina collagene. Questa differisce dalle altre proteine fibrose per la particolare ricchezza in glicina, prolina e idrossiprolina. Il collagene è costituito da un numero variabile di microfibrille, ognuna delle quali è formata da un insieme di molecole elementari note come tropocollagene. A sua volta il tropocollagene è costituito dall'avvolgimento di tre catene polipeptidiche elementari (due  $\alpha 1$  e una  $\alpha 2$ ) di circa 1000 amminoacidi ciascuna (Rasati, 1997).

**L'ipoderma**, o strato sottocutaneo, è formato da tessuto connettivo fibrillare lasso ricco di fibre elastiche e adipociti. Le principali funzioni dell'ipoderma sono: regolazione della termoregolazione, isolamento termico, riserva energetica e protezione da traumi meccanici.

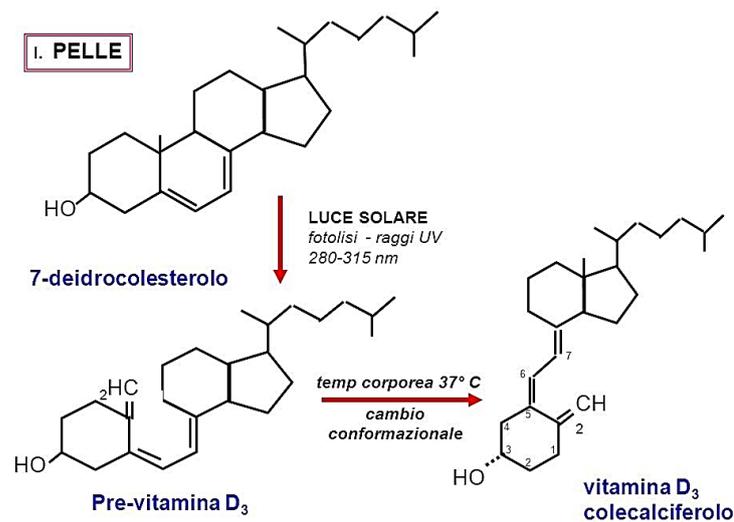
## **2.2 Effetti positivi delle radiazioni UV**

Nonostante sia risaputo che la radiazione solare ultravioletta (UV) può avere implicazioni biologiche negative, molteplici sono anche i miglioramenti che può apportare. La radiazione solare ultravioletta è stata utilizzata fin dall'antichità per il trattamento di varie malattie. La maggior parte degli effetti positivi della radiazione solare sono mediati dalla produzione di vitamina D.

### *Produzione Vitamina D*

La vitamina D è una vitamina liposolubile, viene accumulata nel fegato e non è dunque necessario assumerla con regolarità, attraverso i cibi, dal momento che il corpo la rilascia a piccole dosi quando il suo utilizzo diventa necessario.

Viene sintetizzata attraverso l'assorbimento dei raggi UVB da parte del suo precursore, il 7-deidrocolesterolo (derivato del colesterolo), presente a livello della cute, il quale viene convertito in provitamina D3, un composto intermedio instabile, che nell'arco di 48 ore si converte spontaneamente in un composto termodinamicamente più stabile chiamato vitamina D3 o colecalciferolo (figura 5) (D'Orazio, 2013).



*Figura 5: Sintesi della Vitamina D a partire dal 7-deidrocolesterolo a seguito dell'esposizione ai raggi UVB*

Questa vitamina è un regolatore del metabolismo del calcio e per questo è utile nell'azione di calcificazione delle ossa. Contribuisce inoltre, a mantenere livelli adeguati di calcio e fosforo nel sangue (<https://www.humanitas.it/enciclopedia>).

### Miglioramento dell'umore

L'esposizione alla luce solare è stata collegata al miglioramento dell'energia e all'umore elevato.

L'esposizione dei cheratinociti alle radiazioni UV porta alla produzione di una  $\beta$ -endorfina oppioide che viene rilasciata nel sangue durante l'esposizione ai raggi UV e raggiungendo il cervello in concentrazioni sufficienti, induce miglioramento dell'umore e rilassamento (Juzeniene, 2012).

Inoltre, la produzione del neurotrasmettitore serotonina è favorita dalla vitamina D e quindi è direttamente proporzionale all'esposizione dell'organismo ai raggi UV. I cambiamenti nei livelli di serotonina influenzano l'umore e il comportamento.

## Fototerapia

La fototerapia è una tecnica curativa medica che, attraverso l'utilizzo dei raggi UV, è in grado di riprodurre artificialmente la luce solare e risolvere in modo efficace numerose patologie dermatologiche. Tra queste:

- **Eczema:** È una reazione infiammatoria della pelle non contagiosa caratterizzata dalla presenza di rilievi o vescicole, desquamazione, prurito e arrossamento; ne esistono diversi tipi. L'azione antinfiammatoria della fototerapia consente un buon controllo della malattia. Il trattamento è indicato in particolare in caso di eczemi cronici gravi (con sintomi che persistono per mesi o addirittura anni).
- **Dermatite topica:** È un'infiammazione della pelle che si presenta con la formazione improvvisa di cute secca e pruriginosa e di chiazze rosse con vescicole. Come per l'eczema, anche in questo caso il trattamento di fototerapia dà buoni risultati grazie alla sua azione antinfiammatoria.
- **Acne:** La fototerapia in questo caso aiuta alleviando l'infiammazione, promuovendo la guarigione della pelle e stimolando il sistema immunitario a contrastare l'insorgenza di queste infezioni.
- **Vitiligine:** è una malattia cronica della pelle che provoca la comparsa sulla cute di chiazze chiare, ovvero zone dove manca del tutto la fisiologica colorazione dovuta alla melanina. L'utilizzo di questa metodologia serve per ridurre il contrasto cromatico e rende le chiazze meno visibili.
- **Psoriasi:** Malattia infiammatoria della pelle dovuta all'iperproduzione dei cheratinociti. Grazie agli effetti immunomodulanti ed antinfiammatori dovuti all'esposizione ai raggi ultravioletti, la fototerapia permette di regolare la formazione dei cheratinociti (<https://www.grupposandonato.it/>).
- **Micosi fungoide (MF):** La micosi fungoide è una rara forma di linfoma non-Hodgkin, ossia un tumore maligno che si sviluppa a partire da un particolare tipo di globuli bianchi - in questo caso i linfociti di tipo T. Si tratta di una patologia che interessa prevalentemente la cute, ma che in fase avanzata può estendersi anche ad altri organi del corpo. La soppressione immunitaria indotta da esposizione ai raggi ultravioletti permette la regressione delle

cellule colpite: il trattamento di fototerapia per la micosi fungoide prevede sedute trisettimanali, o meglio a giorni alterni, con dosaggi gradualmente crescenti e commisurati al proprio fototipo. La fototerapia UVB a banda stretta è attualmente il trattamento più efficace nel contrastare la micosi fungoide (<https://www.ederma.net/>).

### Malattie cardiovascolari e ipertensione

Nei pazienti con pressione alta e carenza di vitamina D, è stato dimostrato che l'esposizione ai raggi UVB può abbassare la pressione sanguigna. (<https://www.digikey.com/en/articles/ultraviolet-radiation-attributes-and-benefits>).

### Disinfezione e sterilizzazione

I raggi ultravioletti vengono anche usati per la sterilizzazione di aria, acqua e piani di appoggio previsti in ambienti protetti perché sono in grado di uccidere i microrganismi e inattivare i virus (<https://www.sciencelearn.org.nz>).

## **2.3 Effetti negativi delle radiazioni UV**

In risposta all'esposizione alla luce solare, la pelle risponde aumentando la quantità dello strato morto superiore, lo strato corneo, che agisce come specchio, riflettendo e rifrangendo le radiazioni UVA e UVB.

I raggi UVB rimangono in superficie, colpendo l'epidermide e sono responsabili dell'eritema solare che inizia dopo circa 6-8 ore dall'irradiazione. Causano anche la pigmentazione indiretta dovuta all'attivazione di una reazione biochimica a catena a livello dei melanociti. Gli UVB, inoltre essendo più energetici degli UVA, possono esporre al rischio di fotocarcinogenesi, ossia alla comparsa di tumori cutanei, talvolta maligni (chiamati melanomi), a seguito dei processi fotochimici che inducono mutazioni somatiche.

I raggi UVA, invece, provocano una immediata leggera pigmentazione, chiamata pigmentazione diretta, la cui intensità dipende dal tipo di cute del soggetto, dal grado di abbronzatura precedente e dalla durata dell'esposizione. Sarà più intensa nei soggetti di carnagione scura e tanto maggiore quanto era il grado di abbronzatura

precedentemente acquisita. Questa abbronzatura compare molto rapidamente e altrettanto rapidamente scompare, mentre se l'esposizione agli UVA ad alta intensità è prolungata può durare anche più di qualche giorno. Anche l'UVA può portare alla produzione di eritemi, ma in misura minore rispetto all'UVB.

I raggi UVA sono quelli che penetrano maggiormente nella cute e l'esposizione eccessiva e ripetuta a questi raggi è causa di tumori cutanei e del fenomeno del foto-invecchiamento (photoaging). Infatti, raggiungendo il derma, sono in grado di provocare la rottura delle fibre elastiche e denaturazione di quelle di collagene, responsabili della consistenza, della tensione e resistenza della pelle. Questo provoca una precoce comparsa di rughe, riduzione dell'elasticità e l'accelerazione dell'invecchiamento cutaneo.

Degno di nota, è il fatto che la quantità di raggi UVA che raggiunge la terra è circa dieci volte maggiore rispetto a quella degli UVB, quindi gli effetti a lungo termine delle radiazioni UVA possono essere importanti quanto quelli degli UVB.

L'interazione della radiazione solare con i tessuti biologici, quali la pelle, è legata a due meccanismi principali: *fotochimico*, tipico delle lunghezze d'onda dell'ultravioletto, e *termico*, il meccanismo principale nel caso della radiazione infrarossa. Considerando *l'effetto termico*, quando i fotoni vengono assorbiti, fanno aumentare l'energia cinetica del tessuto e l'energia radiante della radiazione ottica viene convertita in calore. L'aumento della temperatura risultante dipende dalla lunghezza d'onda, dalla durata dell'esposizione e dall'energia totale assorbita dal tessuto. Se l'energia termica è sufficientemente elevata, si possono osservare altri effetti biologici, ad esempio sull'espressione del procollagene con un conseguente aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Inoltre, la sensibilità termica dei diversi tessuti è molto variabile, principalmente in funzione dei processi dissipativi legati all'area della superficie irradiata e alla composizione del tessuto.

Gli *effetti fotochimici*, tipici degli UVR, sono essenzialmente legati all'assorbimento di fotoni da parte di molecole specifiche nei tessuti bersaglio, detti cromofori. Questi effetti dipendono da diversi fattori come la durata dell'esposizione e l'intensità della radiazione. Di conseguenza, un'elevata esposizione a breve termine e

un'esposizione meno intensa ma più prolungata possono indurre effetti simili. Questa caratteristica è nota come Principio di Reciprocità della Fotobiologia, o Legge Bunsen-Roscoe della Fotobiologia (Modenese, 2018).

Nel meccanismo di assorbimento diretto, i cromofori cellulari, come proteine e acidi nucleici, assorbono la radiazione UV e trasformano l'energia assorbita in un segnale biochimico, innescando le successive risposte biologiche

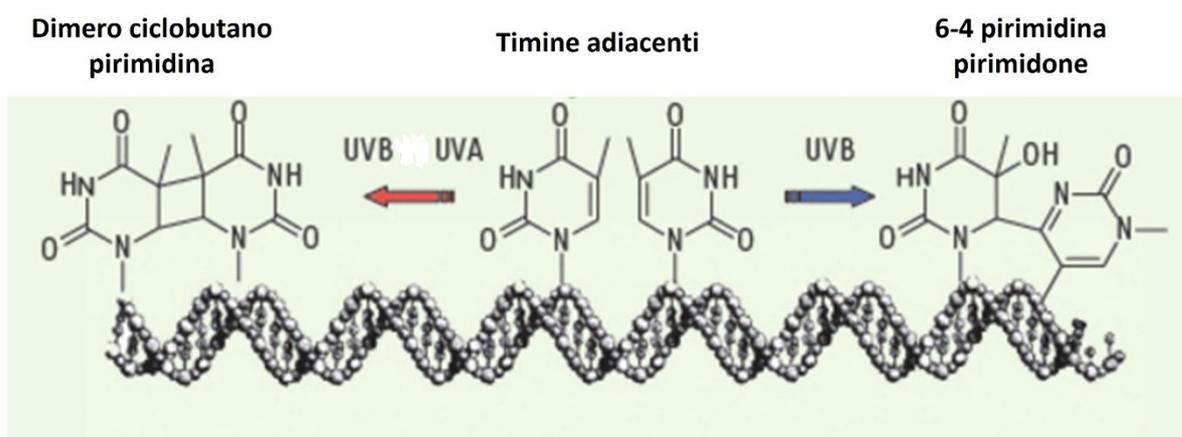
I fotoni UV mediano il danno cutaneo anche attraverso un meccanismo noto come fotosensibilizzazione (Nisakorn, 2015), dove i sensibilizzatori endogeni e/o esogeni assorbono la luce UV e quindi passano da uno stato fondamentale a uno eccitato, determinando ulteriori reazioni che portano alla formazione di ROS e specie reattive dell'azoto (RNS).

Quando la pelle umana è esposta alla luce solare, sarebbe ragionevole concludere che le radiazioni di energia più elevata, come le radiazioni UVB, penetrino più in profondità nella pelle rispetto ai fotoni a bassa energia, come gli UVA e le radiazioni visibili, tuttavia, la pelle contiene una varietà di macromolecole, tra cui RNA, DNA e proteine che assorbono efficacemente i fotoni UVB, la maggior parte dei quali vengono assorbiti dalle macromolecole nell'epidermide. Queste macromolecole sono meno efficienti nell'assorbire i raggi UVA e di conseguenza quest'ultimi penetrano attraverso l'epidermide nel derma.

L'assorbimento dei raggi UVA nell'epidermide e nel derma può causare la formazione di ROS che possono danneggiare le proteine, gli acidi nucleici ed i lipidi nelle cellule.

### 2.3.1 I danni indotti al DNA

L'effetto cancerogeno della radiazione solare UV è esplicato attraverso la sua capacità di danneggiare il DNA. Come già detto, è la luce UVB (290-320 nm), quella più dannosa per il genoma. Il motivo di ciò è noto da quasi mezzo secolo: i fotoni UVB vengono assorbiti direttamente dal DNA in cui inducono reazioni fotochimiche. I principali bersagli sono le basi pirimidiniche timina e citosina che, se si trovano in posizioni adiacenti nella doppia elica, reagiscono a coppie creando nuovi legami covalenti. La struttura chimica delle basi risulta così fortemente alterata in quanto si trovano sotto forma di fotoprodotto, che vengono classificati in due categorie: dimeri di ciclobutano pirimidina (CPD) e 6-4 pirimidina pirimidone, nomi che si riferiscono alla natura dei legami formatisi per creare il danno (*figura 6*).



*Figura 6: Formazione di composti indotti dall'esposizione ai raggi UVA e UVB*

L'esposizione agli UVA, al contrario di quella agli UVB, porta quasi esclusivamente alla formazione del dimero ciclobutano timina-timina, con totale assenza di produzione di fotoprodotto, le modalità con cui essi però si formano sono differenti dai meccanismi promossi dagli UVB.

Queste modificazioni del DNA interrompono fortemente il funzionamento della cellula e possono indurre la morte o anche mutazioni, le quali possono innescare i processi coinvolti nella comparsa dei tumori. Ad esempio, i fotoprodotto bloccano la

trascrizione dell'RNA portando all'attivazione del gene p53 che induce l'apoptosi dei cheratinociti irradiati (Douki, 2007).

Se la radiazione UVB è la più dannosa per il DNA, fortunatamente è una componente minore della luce solare. Negli ultimi 15 anni è però emerso che anche i raggi UVA sono mutageni sebbene il DNA assorba pochissimi fotoni UVA. L'azione genotossica di questi ultimi, infatti non è diretta come quella degli UVB, ma si esplica attraverso la produzione di ROS/RNS, che interagiscono con cromofori endogeni (fotosensibilizzatori) tra cui sono compresi anche gli acidi nucleici.

Come sistema di protezione per il danno al DNA, vi sono però le glicosilasi, coinvolte nel processo di riparazione per escissione delle basi (BER), che riconoscono le basi modificate e le eliminano dal DNA, lasciando un sito abasico, che viene poi processato dalla polimerasi  $\beta$ .

A volte però, quando i danni non vengono corretti nel modo opportuno e vi sono, ad esempio, rotture al singolo filamento (SSB) nella fase G1 del ciclo cellulare, queste possono generare nella fase S, danni alla doppia elica (DSB), portando infine ad aberrazioni cromosomiche o addirittura al blocco totale dei processi di replicazione del DNA. Gli UVA però, non sembrano causare DSB in maniera diretta, a causa della bassa energia dei fotoni (Harrison, 2002).

Anche il DNA mitocondriale è un bersaglio dell'attività dei ROS ed è più suscettibile del DNA nucleare, in quanto non ha la presenza di un sistema di riparazione (Shamim, 2017).

Il principale marker di stress ossidativo a carico del DNA è fornito da 8-idrossideossiguanosina (8-oxo-dG) (Stadtman, 1998).

La deossiguanosina (dG) è uno dei costituenti del DNA e se ossidata si trasforma in 8-oxo-dG. Se il DNA non venisse correttamente riparato prima del meccanismo di replicazione, la presenza dell'8-oxo-dG condurrebbe alla trasversione da G:C a T:A, causando mutagenesi o morte cellulare. In seguito alla morte cellulare, la 8-oxo-dG viene liberata e secreta nelle urine, sia come base singola sia inclusa in oligomeri di DNA. Data la stabilità e la specificità, la concentrazione di 8-OHdG nelle urine è uno dei più affidabili marcatori per valutare il grado di stress ossidativo sistemico (Haghdoost, 2001).

### 2.3.2 I danni a carico dei lipidi

Negli ultimi anni è diventato evidente che l'ossidazione dei lipidi, o perossidazione lipidica, è un passaggio cruciale nella patogenesi di diversi stati patologici nei pazienti adulti e infantili.

I danni indiretti provocati dagli UVA (320-400 nm), non sono una conseguenza diretta della radiazione, ma delle reazioni fotochimiche innescate da essa, che portano alla formazione di ROS.

Il principale bersaglio dei ROS è rappresentato dalla componente fosfolipidica delle biomembrane e delle lipoproteine plasmatiche; nello specifico ad essere attaccati sono principalmente i doppi legami presenti negli acidi grassi polinsaturi (PUFA) che compongono i fosfogliceridi: agendo su di essi ne modificano la struttura, iniziando una serie di reazioni che porteranno alla loro decomposizione chiamata perossidazione lipidica.

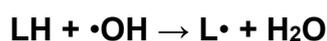
La perossidazione lipidica è un processo generato naturalmente in piccole quantità nell'organismo, principalmente per effetto dei ROS. Queste specie reattive dell'ossigeno attaccano prontamente gli acidi grassi polinsaturi della membrana degli acidi grassi, avviando una reazione a catena che si autopropaga (Mylonas, 1999; Giacomoni, 2020).

In risposta alla perossidazione lipidica di membrana e in base a specifiche circostanze metaboliche cellulari e capacità di riparazione, le cellule possono promuovere la sopravvivenza o indurre la morte cellulare. In condizioni di perossidazione lipidica fisiologica o bassa (condizioni sub-tossiche), le cellule stimolano il loro mantenimento e sopravvivenza attraverso sistemi di difesa antiossidanti costitutivi o attivazione di vie di segnalazione che sovraregolano le proteine antiossidanti determinando una risposta allo stress. Al contrario, con tassi di perossidazione lipidica medi o alti (condizioni tossiche), l'entità del danno ossidativo travolge la capacità di riparazione e le cellule inducono l'apoptosi o la morte cellulare programmata per necrosi; entrambi i processi alla fine portano al danno cellulare molecolare che può facilitare lo sviluppo di vari stati patologici e l'invecchiamento accelerato (Ayala, 2014).

Il processo consiste in una serie di reazioni a catena, suddiviso in tre stadi (inizio, propagazione e terminazione) in cui gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana, si trasformano progressivamente in radicali alchilici o lipidici (L•), radicali perossidi (LOO•) e perossidi lipidici (LOOH) (figura 7). Questi ultimi possono decomporsi facilmente in diverse specie quali alcossidi lipidici (LO•), aldeidi (malondialdeide, MDA), alcani, epossidi lipidici e alcool. Anche il colesterolo può subire modificazioni dello stesso tipo dando origine ad epossidi e alcool.

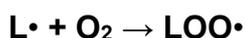
La fase di inizio si ha quando, i ROS con sufficiente reattività, come il radicale idrossile, estraggono un atomo di idrogeno da un gruppo metilene (CH<sub>2</sub>) formando il radicale lipidico (L•).

È la presenza di un doppio legame negli acidi grassi ad indebolire il legame C-H nell'atomo di carbonio adiacente al doppio legame, permettendo così di "strappare" l'idrogeno.



Il radicale tenderà a stabilizzare la sua struttura formando dieni coniugati.

In seguito, il radicale lipidico può reagire con l'ossigeno per dare un radicale perossilipidico (LOO•), portando alla fase di propagazione.

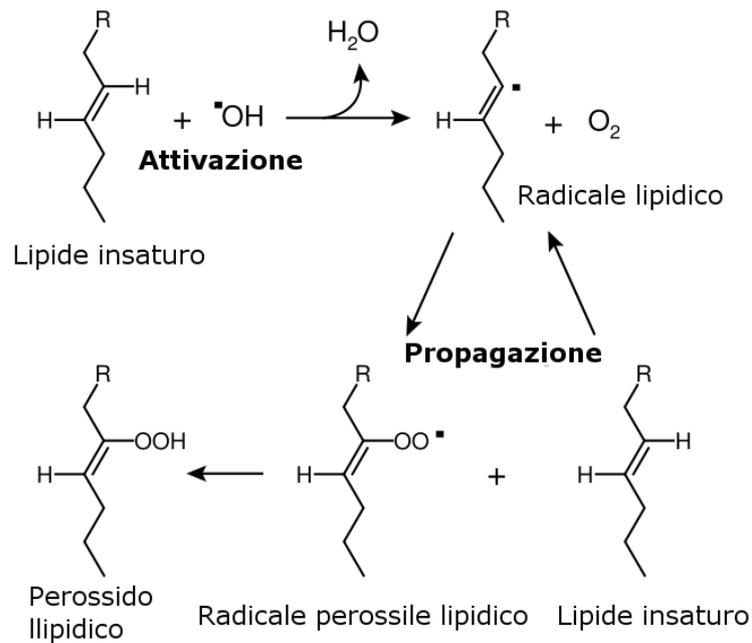


A sua volta questo prodotto, altamente reattivo, estrae un idrogeno da un altro acido grasso polinsaturo, generando un nuovo radicale lipidico (che continua la reazione a catena) e un lipide idroperossido (LOOH) (Ayala, 2014).

I radicali lipidici possono anche trasformarsi in perossidi ciclici o in endoperossidi ciclici (a partire da acidi grassi polinsaturi come l'acido arachidonico o l'acido eicosapentaenoico).

Gli idroperossidi sono molecole non stabili e nel tempo si decompongono dando luogo a prodotti di degradazione, ovvero prodotti finali dell'ossidazione, quali aldeidi, chetoni e idrocarburi.

Nella reazione di terminazione, antiossidanti (come la vitamina E) donano un atomo di idrogeno al LOO<sup>•</sup>, trasformandosi nel corrispondente radicale di vitamina E che reagisce con un altro LOO<sup>•</sup> formando prodotti non radicalici. Una volta iniziata la perossidazione lipidica, si verificherà una propagazione delle reazioni a catena fino alla produzione dei prodotti di terminazione.



*Figura 7: Fasi della perossidazione lipidica*

Tra i prodotti secondari che si possono formare, vi è la malondialdeide (MDA), un'aldeide reattiva in grado di reagire con la deossiguanina e la deossiadenosina del DNA formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi.

Come conseguenza di questo fenomeno, si producono quindi composti citotossici e si ottengono diversi danni alle membrane biologiche come l'alterazione delle proprietà dei recettori di superficie e l'alterata permeabilità di membrana.

### 2.3.3 I danni a carico delle proteine

Le proteine, a causa di una combinazione delle loro caratteristiche di assorbimento dei raggi UV e della loro abbondanza nelle cellule, sono bersagli primari del danno cellulare mediato dai raggi UV.

Le radiazioni UV possono danneggiare le proteine per ossidazione diretta o per legame covalente dei prodotti di degradazione della perossidazione lipidica, con conseguente perdita della funzione proteica e/o dell'attività enzimatica. La produzione dei ROS provoca nelle proteine modificazioni reversibili e/o irreversibili. Le conseguenze funzionali della modificazione delle proteine da parte dei ROS dipendono dalla natura dei ROS e delle proteine, nonché dalle condizioni particolari della loro interazione (Lushchak, 2007).

L'ossidazione delle proteine può comportare la scissione della catena polipeptidica, la modifica delle catene laterali degli amminoacidi e la conversione della proteina in derivati altamente sensibili alla degradazione proteolitica (Stadtman, 2006).

In seguito alle modificazioni ossidative indotte dai radicali su alcuni amminoacidi proteici, possono formarsi composti carbonilici che possono essere utilizzati come markers dell'ossidazione proteica.

Gli amminoacidi solforati, cisteina, metionina, triptofano, così come la tirosina e la fenilalanina, sono i più suscettibili all'ossidazione. L'ossidazione di molti aminoacidi risulta nella formazione di gruppi carbonilici nelle proteine, i quali vengono quindi usati più comunemente per valutare il grado di ossidazione proteica (Lushchak, 2006).

L'ossidazione delle proteine può essere classificata in due categorie generali, uno irreversibile e l'altro reversibile. L'ossidazione irreversibile di solito porta all'aggregazione e alla degradazione delle proteine. Questo tipo di ossidazione include la formazione di carbonili proteici, nitrotirosina e acidi solfonici. D'altra parte, l'ossidazione proteica reversibile è solitamente coinvolta nelle vie di segnalazione redox e nella regolazione della struttura e della funzione delle proteine. Questo tipo di ossidazione si verifica spesso sui residui di cisteina proteica (Yan, 2014).

È stato visto inoltre, che l'azione dei ROS altera le proprietà chimico-fisiche delle proteine, portando ad una variazione del punto isoelettrico e del peso molecolare: il primo causato da ossidazione delle catene laterali degli amminoacidi mediante carbonilazione ed il secondo dovuto alla formazione di legami intramolecolari o alla scissione della proteina in frammenti peptidici (Salo, 1990).

La carbonilazione quando è presente in maniera lieve e progressiva, è associata alla perdita irreversibile della funzione della proteina che viene eliminata dal proteasoma e dunque permette la sopravvivenza cellulare.

L'eccessiva ossidazione e il conseguente cross-linking rendono, invece, le proteine resistenti alla degradazione proteolitica e determinano l'insorgenza della morte cellulare.

Livelli elevati di carbonili proteici sono stati associati ad artrite reumatoide, distrofia muscolare, sclerosi laterale amiotrofica, Alzheimer, catarattogenesi e sindrome da distress respiratorio.

## CAPITOLO 3

### LO STRESS OSSIDATIVO

#### 3.1 Le specie reattive dell'ossigeno

I ROS vengono normalmente prodotti dal nostro corpo e possono avere origine enzimatica (come prodotti principali o sottoprodotti di reazione) o non enzimatica.

Possono originarsi in:

- Mitocondri → i ROS fisiologici vengono principalmente prodotti nei mitocondri, dove l'anione superossido si forma dalla respirazione cellulare.
- Perossisomi → in genere nei perossisomi si origina il perossido d'idrogeno come sottoprodotto, ma può generarsi anche l'anione superossido.
- Reticolo endoplasmatico → in esso sono presenti enzimi della famiglia del citocromo P450 che può generare anione superossido.
- Membrane cellulari → sono in grado di produrre ROS, in particolare il superossido che in questo caso non è un sottoprodotto di una reazione, ma viene volutamente prodotto come molecola segnale o arma di difesa verso i microrganismi.
- Citosol → si possono generare ROS come sottoprodotto del metabolismo dell'acido arachidonico. Di solito i livelli di acido arachidonico nella pelle sono molto bassi, ma possono aumentare in caso di infiammazione.

In aggiunta, nel citosol e negli organelli, l'ossigeno può reagire con lo ione ferro e generare il radicale idrossile, ad elevato potere ossidante.

Tra i fattori esterni che possono generare ROS vi sono invece:

- *raggi UV*
- *altre radiazioni ionizzanti*
- *stress fisico o psicologico severo*
- *assunzione di alcolici*
- *malnutrizione*
- *inquinamento ambientale*
- *condizioni patologiche e stati infiammatori*

I radicali liberi sono piccole molecole diffusibili che differiscono dalla maggior parte delle molecole biologiche in quanto hanno un elettrone spaiato, perciò sono

caratterizzati da instabilità. I radicali liberi tendono ad essere reattivi e possono partecipare a reazioni a catena in cui un singolo evento di inizio dei radicali liberi può essere propagato per danneggiare più molecole (Jones, 2008). Tale processo a catena si conclude solo quando due radicali reagiscono tra loro, neutralizzandosi. La radiazione UV innesca dei processi fotochimici, dovuti ai fotoni dei raggi UV, che ad alte energie provocano rotture a livello di molecole e atomi, mentre ad energie inferiori provocano transizioni di tipo elettronico. L'assorbimento della radiazione luminosa provoca un effetto a livello atomico su una molecola (fotosensitizzatore) chiamato fotosensitizzazione.

Vi sono due tipi di fotosensitizzazione: nel primo il fotosensitizzatore eccitato reagisce direttamente con un substrato, trasferendo un elettrone o un idrogeno, formando così due radicali che in presenza di  $O_2$  possono reagire e produrre prodotti ossigenati. Nel secondo caso il fotosensitizzatore eccitato reagisce con l'ossigeno, trasferendo la sua energia di eccitazione producendo l'ossigeno singoletto, uno stato eccitato dell'ossigeno. Questo reagendo con altri substrati, ritornerà allo stato originale.

I ROS predominanti prodotti dalle radiazioni UV sono l'anione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ) il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), il radicale idrossile ( $HO^{\bullet}$ ) e l'ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ) sono costituiti da specie radicaliche e non radicaliche dell'ossigeno formati dalla riduzione parziale di quest'ultimo (figura 8). I principali RNS prodotti dalle radiazioni UV sono l'ossido nitrico e il biossido di azoto.

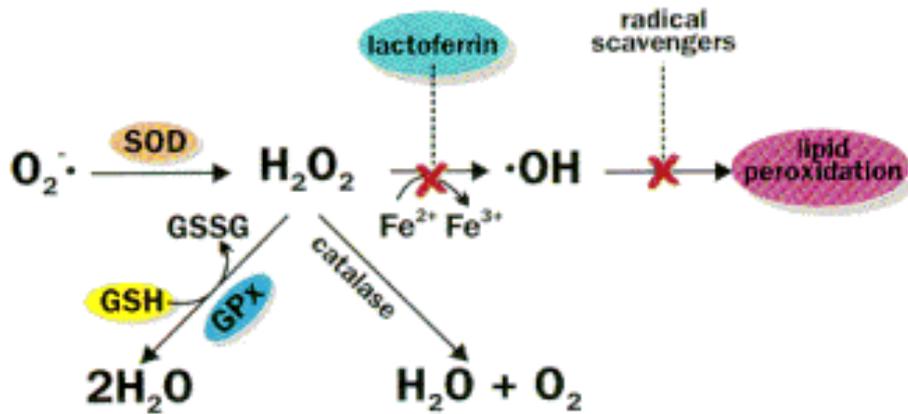


Figura 8: Specie reattive dell'ossigeno

L'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) si ottiene a partire dall'ossigeno, aggiungendo un elettrone nell'orbitale esterno. Questo radicale può essere prodotto, accidentalmente, a livello della catena di trasferimento elettronico mitocondriale, per trasferimento di un elettrone dai trasportatori di elettroni direttamente all'ossigeno, che quindi viene ridotto a radicale superossido.



Nelle nostre cellule il radicale superossido, grazie all'azione della Superossido Dismutasi (SOD), viene rapidamente trasformato in acqua ossigenata e ossigeno, attraverso una reazione nella quale una molecola di superossido si ossida diventando ossigeno e l'altra molecola di superossido si riduce e si protona diventando acqua ossigenata.



Il radicale superossido reagisce con proteine, lipidi, polisaccaridi e acidi nucleici; tuttavia, la sua reattività è piuttosto bassa e, infatti, non rappresenta una sostanza eccessivamente tossica per l'organismo.

Il **perossido d'idrogeno** (o semplicemente acqua ossigenata) può essere ottenuto attraverso riduzione bivalente dell'ossigeno.



L'acqua ossigenata, nonostante la sua scarsa reattività, viene considerata un agente ossidante. Diversamente dal superossido, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  attraversa facilmente le membrane cellulari e può essere rimossa dalla cellula con l'intervento di due enzimi: la catalasi (CAT) e il glutatione perossidasi selenio dipendente (Se-GPx). La pericolosità dell'acqua ossigenata non è dovuta ad un suo attacco diretto a livello dei componenti cellulari, ma all'interazione con le forme ridotte di alcuni ioni metallici, come il ferro bivalente o il rame monovalente, che porta alla formazione dell'idrossi radicale e dello ione ossidrillico.

Il **radicale idrossile** ( $\text{HO}\cdot$ ) è una piccola specie reattiva dell'ossigeno, altamente mobile, solubile in acqua e chimicamente molto reattiva. Questa molecola di breve durata può essere prodotta da  $\text{O}_2$  nel metabolismo cellulare e in una varietà di condizioni di stress. Una cellula produce circa 50 radicali idrossilici ogni secondo. In un giorno intero, ogni cellula genererebbe 4 milioni di radicali idrossilici, che possono essere neutralizzati o che possono attaccare le biomolecole. I radicali idrossilici causano danni ossidativi alle cellule perché attaccano in modo non specifico le biomolecole situati a meno di pochi nanometri dal loro sito di generazione e sono coinvolti in disturbi cellulari come neurodegenerazione, malattie cardiovascolari e cancro. Si presume generalmente che il radicale idrossile, nei sistemi biologici si formi attraverso il ciclo redox dalla reazione di Fenton, dove il ferro libero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) reagisce con il perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e la reazione di Haber-Weiss che si traduce nella produzione di  $\text{Fe}^{2+}$  quando il superossido reagisce con il ferro ferrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (figura 9). Oltre al ciclo redox del ferro descritto sopra, anche un certo numero di altri metalli di transizione tra cui Cu, Ni, Co e V possono essere responsabili della formazione di  $\text{HO}\cdot$  nelle cellule viventi.

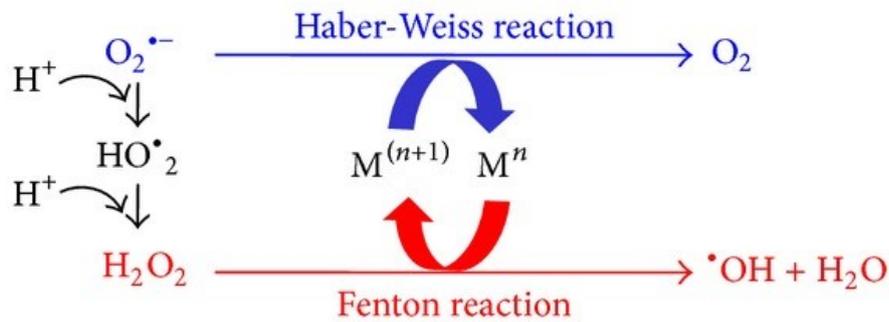


Figura 9: Reazioni che portano alla formazione del radicale idrossile

L'**Ossigeno singoletto** ( $^1O_2$ ), di tutte le specie reattive dell'ossigeno conosciute, è una frazione molto attiva, che agisce accelerando il tasso di invecchiamento della pelle. Se si esamina la struttura elettronica dell'ossigeno molecolare, si vede nella molecola biatomica la presenza di due elettroni non accoppiati posti sul livello energetico più elevato, rendendo questa molecola un diradicale. Se però l'ossigeno assorbe energia sufficiente per invertire lo spin di uno dei suoi elettroni non appaiati, si forma l'ossigeno singoletto.

I ROS (soprattutto anione o radicale superossido  $O_2^{\bullet-}$ ) si producono, nel corso di un normale metabolismo, come nel processo di fosforilazione ossidativa mitocondriale, oppure possono derivare da interazioni con fonti esogene come composti xenobiotici (Ray, 2012).

I ROS sono costantemente generati nei cheratinociti e nei fibroblasti però vi sono dei sistemi di difesa, atti a limitare e a contenere il danno ossidativo indotto dai ROS, in modo che vengano rapidamente rimossi. Quest'azione viene esplicata da piccole molecole antiossidanti non enzimatiche (acido ascorbico, tocoferolo, ubiquinolo e glutazione) ed enzimatiche (catalasi, superossido dismutasi, tioredossina riduttasi, glutazione perossidasi e glutazione riduttasi) per mantenere un equilibrio tra specie pro- ossidanti e antiossidanti.

Tuttavia, la presenza di radicali liberi in eccesso porta alla perdita dell'integrità cellulare, a causa della modifica del DNA e dell'espressione anormale dei geni cellulari, generando quello che viene chiamato stress ossidativo.

### **3.2 Lo stress ossidativo**

Quando i ROS sopraffanno il sistema di difesa antiossidante cellulare, sia attraverso un aumento dei livelli di ROS che una diminuzione della capacità antiossidante cellulare, si verifica lo stress ossidativo. Lo stress ossidativo provoca danni diretti o indiretti mediati da ROS di acidi nucleici, proteine e lipidi ed è stato implicato nella cancerogenesi, neurodegenerazione, aterosclerosi, diabete e invecchiamento.

Lo stress ossidativo, quindi, deriva da un aumento dei ROS o da una diminuzione delle difese antiossidanti; i ROS sono caratterizzati dall'aver una notevole reattività chimica che li rende molto instabili ed in grado di ossidare le catene idrocarburiche degli acidi grassi insaturi, i residui amminoacidici delle proteine, i carboidrati e le basi azotate degli acidi nucleici. Il danno ossidativo da parte dei ROS porta, in casi estremi, all'alterazione e alla compromissione della funzione di tutte le strutture e le macromolecole cellulari con conseguente morte cellulare (Ray, 2012).

La presenza di ROS è la causa o la concausa di uno squilibrio ossidativo nelle componenti cellulari e nei distretti corporei, ove si riscontra in vari quadri clinici: diabete, aterosclerosi, Parkinson, Alzheimer, ictus, cancro, malattie neurodegenerative e invecchiamento.

Lo stress ossidativo è oggetto di numerosi studi, la maggior parte dei quali si concentra sugli effetti negativi esercitati sia a livello molecolare che cellulare, ignorando i possibili benefici dei radicali liberi.

La presenza di ROS in dosi piccole o moderate è considerata benefica per le funzioni fisiologiche coinvolte nella progressione del ciclo cellulare, come la differenziazione, la proliferazione delle cellule e apoptosi e autofagia cellulare, eventi molto importanti per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

È stato anche osservato che la riduzione dei livelli di ROS al di sotto di una certa soglia ostacolerebbe la proliferazione la risposta immunitaria.

La presenza di ROS è fondamentale per l'attività del sistema immunitario, dato che la distruzione di microrganismi patogeni da parte dei leucociti si basa sulla generazione di specie reattive.

Inoltre, l'attivazione dei linfociti T e dei macrofagi richiede quantità limitate di  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ ; quindi neutralizzare questi livelli fisiologici porterebbe a effetti negativi sul

sistema immunitario. Tuttavia, è necessario che venga mantenuto un equilibrio di questo stress ossidativo poiché un eccesso di ROS può compromettere la vitalità dei linfociti T.

Si può dedurre quindi il ruolo essenziale della presenza di ROS, sempre a livelli moderati, per l'omeostasi del corpo (Jitca, 2022).

## CAPITOLO 4

### I FILTRI SOLARI

#### 4.1 I filtri solari come mezzi di protezione dall'esposizione agli UV

La prima difesa contro l'esposizione al sole, come già menzionato, è la produzione di melanina. Questo pigmento assorbe i pericolosi raggi UV e quindi protegge le cellule della pelle dagli effetti dannosi dell'esposizione ai raggi ultravioletti. In determinate circostanze, la quantità di melanina prodotta non è però sufficiente a proteggere la pelle, con conseguente sviluppo di scottature solari. Quando poi il danno ossidativo supera le difese antiossidanti della pelle, le successive modifiche nel meccanismo di redox cellulare, portano ad un'alterazione dell'omeostasi cellulare ed allo sviluppo di processi degenerativi. Pertanto, è importante proteggere la pelle in altri modi; diversi sono i rimedi che si possono adottare per evitare conseguenze dannose, tra cui evitare il sole, cercare l'ombra, l'uso di barriere fisiche come indumenti protettivi e occhiali da sole che possono servire come un modo efficace per schermare i raggi UV rispettivamente dalla pelle e dagli occhi e l'utilizzo di creme solari (Burnett, 2012).

L'utilizzo dei primi filtri solari risale alla fine del diciannovesimo secolo, quando Friedrich Hammer, per la prima volta, pubblicò una monografia sull'efficacia di differenti prodotti chimici nella protezione dalle scottature solari. Da qui grandi passi furono fatti in poco tempo, facilitando l'immissione in commercio del primo filtro solare negli Stati Uniti nel 1928, a base di benzilsalicilato e benzilcinnamato.

Negli anni successivi, tuttavia, agli agenti fotoprotettivi è stata prestata poca attenzione e il loro uso è stato piuttosto limitato.

Fu solo durante gli anni '70, tuttavia, che le creme solari divennero popolari, con l'incorporazione di diversi filtri UVB in creme e lozioni.

Dopo gli anni '80 diversi studi hanno dimostrato il ruolo della luce ultravioletta nello sviluppo di neoplasie cutanee indotte anche dai raggi UVA, quindi da questi anni in poi, i protettivi solari sono stati intesi non solo come agenti contro le scottature solari,

ma anche come elementi importanti nella prevenzione delle scottature solari, in particolare in relazione allo sviluppo di neoplasie cutanee (Schalka, 2011).

Questi eventi hanno aperto le porte alla sperimentazione in ambito cosmetologico e dermatologico, promuovendo nei successivi anni l'identificazione di numerosissimi composti in grado di garantire un'efficace azione schermante nei confronti degli UV. Milioni di persone usano lozioni, creme e spray per la protezione solare sulla pelle per prevenire le scottature e i conseguenti danni a carico di essa. Al fine di ottenere una capacità protettiva completa (ad ampio spettro) è necessario utilizzare più filtri solari. La sinergia d'azione, se ben calibrata, permette di ottenere prodotti con migliore performance.

#### 4.2 Filtri chimici e filtri fisici: Le differenze tra loro

I filtri UV possono essere classificati in due gruppi in base alla loro natura: organici e inorganici (figura 10). I filtri UV inorganici, o anche cosiddetti filtri UV fisici, funzionano principalmente riflettendo e disperdendo la radiazione UV, oltre ad assorbirla in parte, mentre i filtri UV organici, o anche chiamati filtri UV chimici, assorbono la luce (Chisvert, 2007).

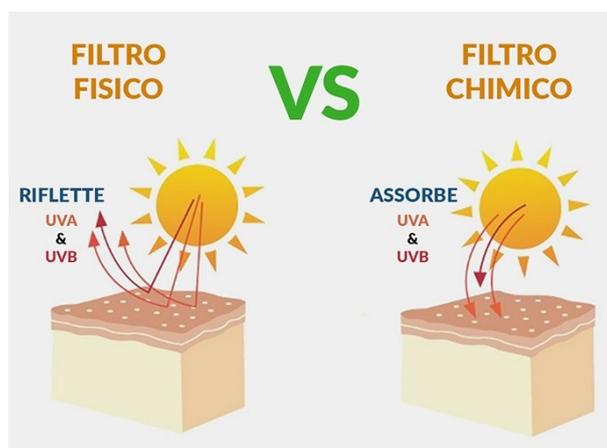


Figura 10: Meccanismo d'azione dei filtri solari fisici e chimici

### Filtri fisici

I filtri UV fisici sono generalmente ossidi metallici, sebbene siano stati utilizzati anche silicati e talco. Si tratta di sostanze che hanno proprietà schermanti, e che grazie alla loro opacità, oppongono un vero e proprio schermo alle radiazioni UV. Sono formati da piccole particelle minerali in grado di riflettere i raggi solari, per cui questi non possono più raggiungere la cute. Le radiazioni solari vengono riflesse o diffuse e non assorbite dalla superficie cutanea. Non provocano quindi surriscaldamento della pelle anzi la proteggono efficacemente. Si tratta di sostanze che però, riflettendo anche la luce visibile, lasciano sulla pelle un sottile strato bianco esteticamente e cosmeticamente poco gradevole.

Sono proprio le proprietà riflettenti che determinano l'efficacia dei filtri solari. Queste proprietà includono l'indice di riflessione, la dimensione delle particelle, lo spessore del film e la dispersione della base: maggiore è l'indice di riflessione, migliore è il filtro UV. Ridurre la dimensione delle particelle a una forma micronizzata (da 10 a 50 nm) è esteticamente più attraente ma porta alla protezione di lunghezze d'onda più corte e aumenta il rischio di assorbimento sistemico (Heurung, 2014).

I filtri fisici più usati sono l'ossido di zinco (ZnO) e il biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>).

L'ossido di zinco microfine protegge da un'ampia gamma di raggi UVA, inclusi gli UVA 1 (da 340 a 400 nm). È molto fotostabile e non reagisce con altri filtri UV. È più efficace del biossido di titanio per la protezione dai raggi UVA, tuttavia, è meno efficiente contro le radiazioni UVB.

Il biossido di titanio microfine protegge dai raggi UVA2 (da 315 a 340 nm) e dai raggi UVB ma non dai raggi UVA1, come fa l'ossido di zinco. Ha una dimensione delle particelle più piccola e un indice di rifrazione più elevato rispetto all'ossido di zinco, facendolo apparire bianco e rendendolo esteticamente meno attraente.

Con l'introduzione però di formulazioni micro e nanoparticellari, i filtri solari al biossido di titanio e all'ossido di zinco sono stati oggetto di un esame più approfondito.

Le due preoccupazioni più importanti rilevate sono state il potenziale delle nanoparticelle di generare ROS quando esposte ai raggi UV che possono causare

danni al DNA all'interno delle cellule della pelle e la penetrazione dermica di queste stesse nanoparticelle.

Per ridurre la produzione di ROS da parte dei filtri inorganici, le nanoparticelle vengono rivestite, ad esempio con sostanze come silice e dimeticone, in modo da stabilizzare questi filtri inorganici (Gabros, 2022).

Uno dei motivi principali per utilizzare i filtri UV inorganici è che non solo offrono un maggiore grado di protezione dai raggi UV rispetto ai filtri inorganici, ma come filtri fisici hanno un ulteriore vantaggio in quanto la penetrazione della pelle è limitata.

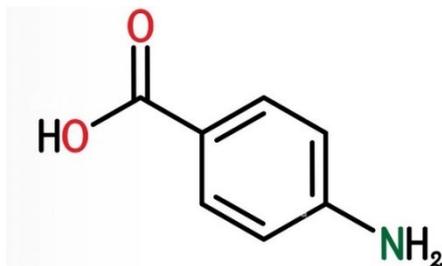
Dei due filtri fisici approvati, alcuni ritengono che  $\text{TiO}_2$  sia molto efficace nell'assorbire principalmente UVB, mentre  $\text{ZnO}$  assorbe principalmente la radiazione UVA; quindi, la combinazione di entrambi le nanoparticelle di  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$  fornirebbero un'ampia protezione della pelle contro gli UVB/UVA.

La concentrazione massima ammessa nelle formulazioni dei prodotti cosmetici, indipendentemente se sottoforma di nanoparticelle o meno, è del 25% sia per l'ossido di zinco che per il biossido di titanio.

### Filtri solari chimici

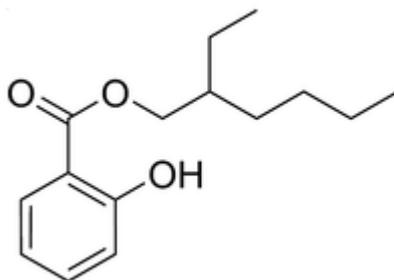
I filtri solari chimici sono conosciuti come filtri solari organici. Sono sostanze di sintesi con una struttura chimica che consiste, in genere, di un anello aromatico coniugato con un gruppo carbonile. Questa particolare struttura consente l'assorbimento dei raggi UV ad alta energia e corta lunghezza d'onda, facendo sì che la molecola raggiunga uno stato eccitato; ritornando allo stato energetico iniziale, emette radiazioni di una lunghezza d'onda maggiore, non dannose per la cute umana. La gamma specifica di lunghezza d'onda che assorbe un filtro solare varia, per cui i filtri solari chimici possono filtrare raggi UVA o UVB o entrambi; quelli che filtrano entrambi i tipi di radiazioni sono definiti ad ampio spettro.

I filtri UVB più potenti sono gli Aminobenzonati, il cui uso però è diminuito a causa della fotosensibilità all'acido paraminobenzoico (PABA) (figura 11), un filtro UVB molto efficace ma responsabile di fotoallergie da contatto sulla pelle che è stato ritirato dal mercato e non è più utilizzato nelle formulazioni per la protezione solare a causa dei suoi effetti negativi.



*Figura 11: Struttura chimica dell'acido paraminobenzoico*

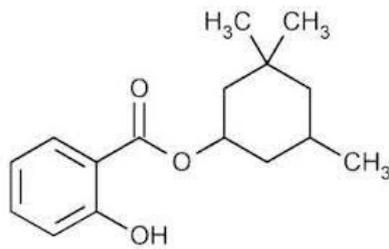
I Cinnamati hanno sostituito il PABA, e l'octilmetossicinnamato (OMC) è uno dei filtri UVB più comunemente usati a livello mondiale, tuttavia è poco fotostabile (figura 12).



*Figura 12: Struttura chimica di octilmetossicinnamato*

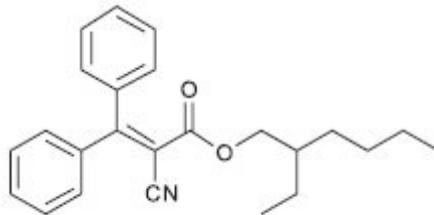
Un'altra opzione sono i Salicilati che però devono essere usati ad alte concentrazioni in quanto assorbono debolmente, ma vengono usati per aumentare l'effetto di altri filtri UVB (Kullavanijaya, 2005).

Un esempio appartenente a questa classe è l'omosalato (HMS) (figura 13).



*Figura 13: Struttura chimica di omosalato*

L'Octocrilene (figura 14) è un altro filtro chimico che assorbe nella regione degli UVB, a cui è associata una ridotta probabilità di irritazione, fototossicità e potenziale fotoallergico (Nash, 2006).

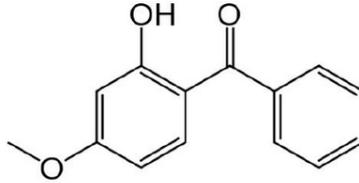


*Figura 14: Struttura chimica dell'octocrilene*

I bloccanti UVA includono vari composti, tra cui i Benzofenoni, Antranilati, e gli Avobenzoni.

I Benzofenoni tipici assorbono principalmente gli UVB; tuttavia, l'ossibenzone (BP-3 o benzofenone-3) (figura 15) è considerato un filtro ad ampio spettro in quanto può assorbire anche gli UVA II, diventando quindi uno dei benzofenoni più comunemente usati.

Questo composto però ha una maggiore probabilità di indurre dermatite da contatto o foto-contatto e vi è una preoccupazione per gli effetti avversi cancerogeni ed endocrini a cui potrebbe portare (Elmets, 2014).



*Figura 15: Struttura chimica del benzofenone-3*

Gli Antranilati sono filtri UVB e UVA molto deboli e sono meno efficaci dei benzofenoni, vengono quindi usati più raramente.

Gli Avobenzoni hanno un'elevata efficacia contro gli UVA I (>380 nm); tuttavia sono molto fotoinstabili e perdono dal 50% al 90% delle loro protezioni dopo 1 ora di esposizione ai raggi UV (Gabros, 2022).

Il butilmetossidibenzoilmetano (BMDBM), noto anche come avobenzone, è uno degli ingredienti più utilizzati nelle formulazioni solari grazie alla sua capacità di bloccare un'ampia gamma di radiazioni UVA (Li, 2022).

Tuttavia, il BMDBM soffre di una sostanziale decomposizione sotto l'esposizione alla luce solare che porta a una diminuzione dell'efficacia fotoprotettiva delle formulazioni cosmetiche che lo utilizzano. Sono state esplorate diverse strategie per migliorare i filtri solari contenenti avobenzone. Ad esempio, è noto che l'associazione avobenzone-octocrilene migliora la fotostabilità dell'avobenzone (Lhiaubet-Vallet, 2010).

Nella tabella successiva (tabella 1) vengono mostrati i vari filtri organici utilizzati, la regione dove assorbono e le concentrazioni massime ammesse nei prodotti solari in UE.

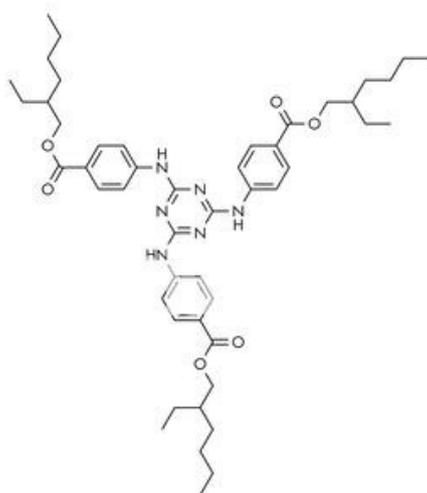
SIGLA	NOME	UVA	UVB	CONCENTRAZIONE MASSIMA
<b>PABA</b>	Acido paraminobenzoico			Il suo utilizzo è vietato
<b>OMC</b>	Octilmetossicinnamato			10%
<b>OCR</b>	Octocrilene			10%
<b>HMS</b>	Omosalato			10%
<b>BP-3</b>	Benzofenone-3			6%
<b>BMDBM</b>	ButilMetossiDiBenzoilMetano			5%
<b>DTS</b>	Drometrizolo trisiloxano			15%

*Tabella 1: Caratteristiche generali di vari filtri organici tradizionali*

I filtri finora citati vengono però indicati come filtri tradizionali, alcuni dei quali sono anche stati eliminati dalle formulazioni tipiche delle creme solari.

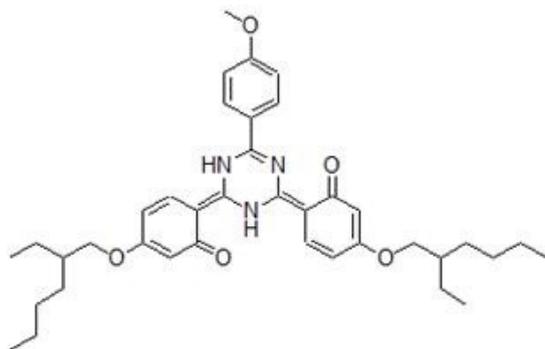
Vi sono però dei filtri di nuova generazione che ora sostituiscono sempre di più i filtri tradizionali.

L'etiliesil triazina (EHT) (figura 16) è un filtro UVB di nuova generazione che possiede un alto coefficiente di estinzione ma il suo campo di assorbimento è molto ristretto. Si tratta di un derivato ottenuto dall'esterificazione dell'acido metossicinnamico. È tra i filtri UVB più utilizzati nell'industria cosmetica, per il basso costo e l'efficacia filtrante.



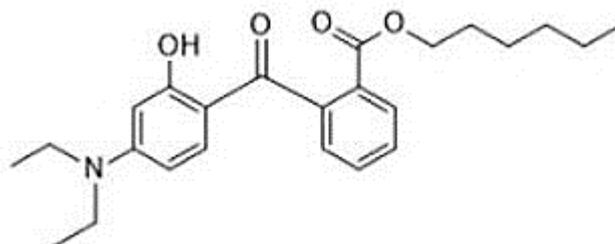
*Figura 16: Struttura chimica del etilesil triazina*

Bis-etilesilossifenolo metossifenolo triazina, noto anche come Tinosorb S o BEMT, (figura 17), è un filtro organico di nuova generazione, solubile in olio, altamente fotostabile e che assorbe radiazioni tra 280-380 nm con un coefficiente d'estinzione tra i più alti tra i filtri solari organici consentiti in Europa. Ha un'alta fotostabilità e per questo è un importante stabilizzante dell'Avobenzone.



*Figura 17: Struttura chimica di bis-etilesilossifenolo metossifenolo triazina*

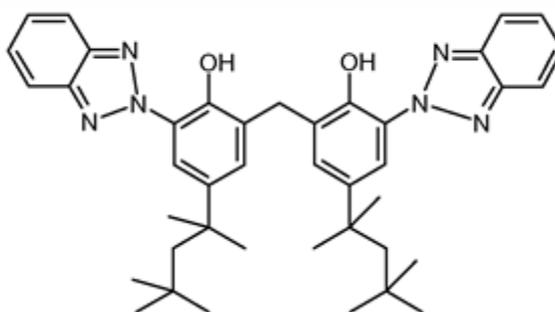
Il dietilamino idrossibenzoil esil benzoato (DHHB) (figura 18), è un successore di BMDBM e per questo le sue proprietà spettrali sono simili all'Avobenzone; si differenzia però da quest'ultimo per la sua maggiore fotostabilità.



*Figura 18: Struttura chimica del Dietilamino idrossibenzoil esil benzoato*

Il metilene bis-benzotrizolil tetrametilbutilfenolo triazina (MBBT) noto anche come Tinosorb M, (figura 19), è un filtro organico, fotostabile basato sul benzotriazolo. Possiede un ampio spettro di assorbimento, assorbendo sia negli UVA che negli UVB, ma con un coefficiente d'estinzione più basso rispetto al Tinosorb S.

Questo filtro è l'unico filtro organico presente come microparticolato (0.2 µm), cioè come particelle microfine. Ha inoltre un effetto stabilizzante su altri filtri UV come OMC e BMDBM.



*Figura 19: Struttura chimica di MBBT*

Nella tabella successiva (tabella 2) vengono mostrati i vari filtri organici di nuova generazione utilizzati, la regione dove assorbono e le concentrazioni massime ammesse nei prodotti solari in UE.

SIGLA	NOME	UVA	UVB	CONCENTRAZIONE MASSIMA
EHT	Etilsil triazone			5%
BEMT	Bis-etilesilossifenolo metossifenolo triazina			10%
DHNB	Dietilamino Idrossibenzoil Esil Benzoato			10%
MBTT	Metilene Bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenolo triazina			10%

*Tabella 2: Caratteristiche generali di vari filtri organici di nuova generazione*

### 4.3 Caratteristiche ideali di un filtro solare

Un filtro solare ideale dovrebbe presentare diverse caratteristiche come:

- un'efficacia di protezione nei confronti sia dei raggi UVA che degli UVB;
- una stabilità al calore e possibilmente all'acqua;
- un'elevata stabilità chimica;
- un'elevata compatibilità per la cute;
- una bassa tossicità per l'uomo e l'ambiente.
- dovrebbe essere inerte
- non dovrebbe essere irritante
- efficace a basso dosaggio

### Fotostabilità

La fotostabilità è una proprietà di un filtro solare o di una miscela di filtri e indica la sua capacità di mantenere inalterato il proprio potere protettivo, inteso come assorbanza spettrale, anche durante lunghe esposizioni al sole.

La fotostabilità dei filtri solari è una considerazione importante nello sviluppo e nelle successive prestazioni poiché questi filtri sono progettati per assorbire la luce UV. L'assorbimento della luce UV può portare a reazioni fotochimiche di queste molecole come:

- Isomerizzazione trans-cis: dove la forma trans ha un coefficiente di assorbimento maggiore rispetto alla forma cis
- Tautomerismo cheto-enolico
- Capacità di reagire con altri filtri UV
- Degradazione: la molecola si lisa formando delle specie radicaliche (fotolisi)

Un filtro non fotostabile subisce trasformazioni strutturali che ne alterano le caratteristiche filtranti e la capacità protettiva, cambiando di conseguenza anche lo spettro di assorbanza. La fotoinstabilità può essere anche accompagnata dalla formazione di diversi fotoprodotto di degradazione, tra i quali i radicali liberi.

Se il filtro solare non è stabile, cioè si degrada con l'esposizione alla luce UV, il rischio è che la sua efficacia non sia sempre uguale e protegga di meno dalle radiazioni e la diminuzione della capacità filtrante di un determinato filtro nei confronti dei raggi UVB comporta una riduzione dell'SPF (Sun Protection Factor), e rischio di scottature, mentre la diminuzione della capacità filtrante di raggi UV-A potrebbe inizialmente passare inosservata ma con il tempo provocare gravi effetti cronici.

Esempi di filtri indagati per essere fotoinstabili sono l'octil-metossicinnamato e il 2-etil-esil-4-dimetilaminobenzoato, per quanto riguarda gli UVB, mentre nel campo degli UVA vi è il butil-metossi-dibenzoilmetano (BMDBM).

In questo contesto, la FDA (U.S. Food and Drug Administration) scoraggia la presenza simultanea di OMC e BMDBM nelle formulazioni di protezione solare a

causa della loro intrinseca fotoinstabilità che potrebbe produrre alcuni fotoaddotti indesiderati (Serpone, 2021).

Il BMDBM esiste in due diverse forme tautomeriche (figura 20): la forma chetonica che assorbe la luce a circa 265 nm e la forma enolica che assorbe la luce a circa 355 nm (Kojić, 2016). La forma enolica è la forma dominante nei filtri solari.

A seguito dell'esposizione di BMDBM agli UV, possono verificarsi diversi percorsi di fotoisomerizzazione, inclusa la tautomerizzazione cheto-enolica (Berenbeim, 2020) che genera un tautomero dicheto. Questo poi subisce una fotorottura che porta alla produzione di radicali liberi.

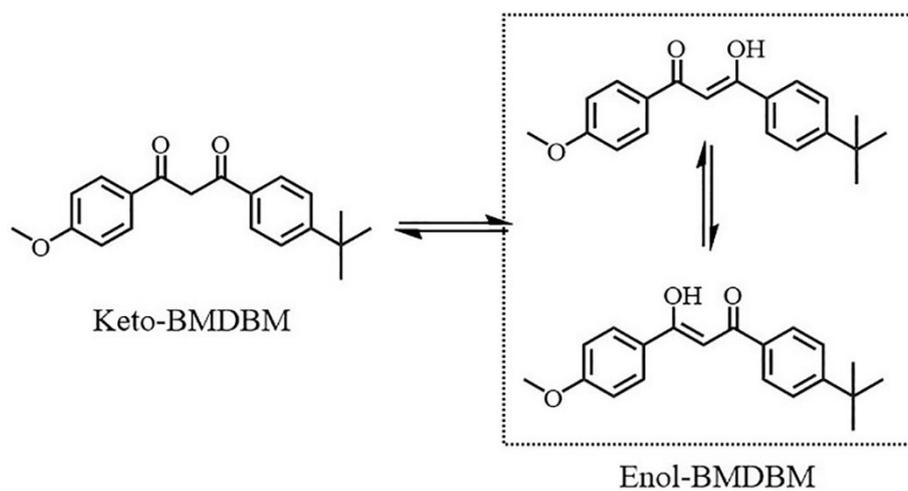
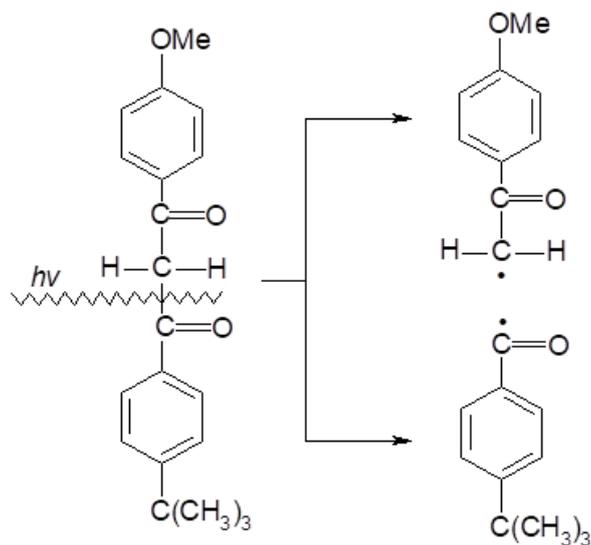


Figura 20: Modificazione chimica del BMDBM dovuta ad esposizione ai raggi UV

Assorbendo la radiazione il BMDBM va incontro quindi a scissione omolitica, dando origine a specie radicaliche centrate sul carbonio (figura 21). Questi radicali sono la causa più probabile di danni al DNA e alle membrane lipidiche descritti in precedenza.



*Figura 21: Produzione di specie radicaliche da parte del filtro BMDBM dopo l'esposizione alle radiazioni UVA*

Il controllo della foto-stabilità è, pertanto, un aspetto molto importante da considerare nel momento in cui si sviluppa una gamma di prodotti solari (Kockler, 2012).

Per determinare la fotostabilità di un composto, viene applicata una dose fissa di prodotti per la protezione solare su un substrato otticamente accettabile. In seguito, viene poi misurato lo spettro di assorbanza nella zona UVA/B dell'ultravioletto che viene poi confrontato con lo spettro di assorbanza del composto ottenuto dopo esposizione alla radiazione UV simulata dal sole. In questo modo si possono ottenere informazioni sulla fotostabilità del composto in seguito all'esposizione ai raggi UV (Nash, 2014).

## SPF

Il fattore di protezione solare (SPF) è il dato più importante per quantificare l'efficacia di una protezione solare, essendo universalmente accettato.

Anche i primi filtri solari moderni commercializzati negli anni '30, erano caratterizzati dal fattore di protezione solare (SPF) che rappresenta una misura dell'efficacia della crema nel proteggere un individuo dalle scottature provocate dall'esposizione ai raggi UV-B; maggiore è l'SPF, maggiore è la protezione offerta dalla crema solare (Schalka, 2011).

Il metodo si basa sulla determinazione della dose minima eritematosa (MED), definita come la minima quantità di raggi UV necessaria per innescare l'eritema, in aree di pelle protetta e non protetta. Il valore SPF viene quindi calcolato come rapporto tra la MED della pelle protetta e quella non protetta. Poiché gli UVB sono circa 1000 volte più eritematogeni rispetto agli UVA, l'SPF è in gran parte una misura di protezione contro gli UVB.

Il Sun Protection Factor quantifica la protezione che un determinato prodotto è in grado di offrire, in termini di tempo di esposizione, contro le scottature rispetto all'esposizione non protetta. Pertanto, se un particolare protettore ha un SPF di 30, ciò significa, in pratica, che è necessaria un'esposizione al sole 30 volte maggiore per produrre eritema, rispetto alla situazione in cui questo utilizzatore non utilizzerebbe quel protettore.

Per determinare il valore SPF, un gruppo da 10 a 20 volontari, di diversi fototipi (classificazione determinata sulla qualità e quantità di melanina presente in condizioni basali sulla pelle), vengono selezionati e sottoposti a dosi progressive di radiazione UV emessa da una sorgente di luce artificiale, denominato simulatore solare, in zone di cute non protetta e protetta dalla crema solare in studio, applicata nella quantità di 2 mg/cm<sup>2</sup>. Dopo circa 16-24 ore di esposizione, si valuta la MED nelle due aree e si calcola il rapporto. La media dei valori riscontrati nel gruppo dei volontari è il Fattore di Protezione Solare del prodotto.

In base ai valori di SPF (figura 22) le creme solari possono essere classificate in creme a:

- Protezione bassa: SPF compreso tra 6 e 10
- Protezione media: SPF compreso tra 15 e 25
- Protezione elevata: SPF compreso tra 30 e 50
- Protezione molto elevata: SPF  $\geq 50$



*Figura 22: Classificazione creme solari in base al Sun Protection Factor (SPF)*

Il fattore di protezione solare è ancora l'informazione principale sull'efficacia fotoprotettiva di una crema solare, ma la sua interpretazione non dovrebbe basarsi solo sul valore numerico stesso, ma anche sul corretto modo di utilizzare il prodotto, in termini di quantità applicata e regolarità nella riapplicazione. Infine, nella scelta di un agente fotoprotettivo, oltre all'SPF e alla fotostabilità, dovrebbero essere presi in considerazione i dati relativi alla sostanza (resistenza all'acqua), e alla protezione UVA per avere una corretta fotoprotezione (Schalka, 2011).

### Protezione ai raggi UVA

Per quantificare la protezione di una crema solare contro gli UVA, COLIPA (European Cosmetics Trade Association) ha sviluppato un nuovo metodo *in vitro* per misurare la protezione UVA in modo standardizzato e riproducibile. Prima dello sviluppo di questo metodo, ci si basava su test *in vivo* che includevano

la valutazione di IPD (Immediate Pigment Darkening), PPD (Persistent Pigment Darkening) e il fattore di protezione negli UVA (PFA) (Palm, 2007).

L'IPD descrive l'immediata pigmentazione grigio-marrone della pelle causata dall'ossidazione dei melanosomi preformati nella pelle e raggiunge il picco entro il primo minuto dopo l'esposizione ai raggi UVA; il metodo PPD, valuta l'efficacia della protezione solare contro i raggi UVA misurando la fotossidazione della melanina dopo l'esposizione e a differenza dell'IPD, viene misurato tra 2 e 24 ore dopo l'irradiazione. Il PFA ha un endpoint meno inclusivo dopo l'irradiazione UVA, che misura l'eritema o la pigmentazione (abbronzatura) e come il PPD, viene valutato 24 ore dopo l'esposizione alla luce.

A differenza dei test *in vivo*, i test di laboratorio possono essere un metodo di test più efficiente, riproducibile ed economico.

Il metodo, messo a punto dal gruppo COLIPA 'In vitro Sun Protection Methods', si basa sulla misurazione della trasmissione della radiazione UV (UVR) attraverso un film sottile di campione protettivo solare distribuito su un substrato trasparente agli UVR, prima e dopo l'esposizione a una dose controllata di UVR da una sorgente definita di radiazione solare simulata (RSS). Si basa quindi, sullo spettro di assorbanza del protettivo UV *in vitro* e su dati di assorbanza ottenuti *in vivo* attraverso il PPD, il quale si determina misurando la dose di radiazione UVA che provoca un iscurimento persistente della pelle. Questo permette di ottenere un fattore di protezione agli UVA *in vitro* (UVAPF) che è correlato ad una misura *in vivo*. Questo metodo è stato pubblicato come linea guida COLIPA, attualmente utilizzata nelle aree geografiche europee per testare ed etichettare i prodotti per la protezione solare (Matts, 2010).

#### **4.4 Regolamentazione filtri solari**

A causa del loro ruolo nel proteggere la pelle dagli effetti dannosi dei raggi UV, i filtri solari devono essere regolamentati. La regolamentazione dei filtri solari varia a seconda del Paese e/o dei requisiti dell'agenzia di regolamentazione competente.

### *Linee guida della Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti*

Le creme solari sono state regolamentate dalla FDA dagli anni '70, ma di recente hanno attirato molta attenzione.

In precedenza, le linee guida della FDA miravano alla protezione dai raggi UVB e alle scottature solari e non alla protezione dai raggi UVA e alla prevenzione dei tumori della pelle. Oggi, invece, è obbligatorio testare sia le radiazioni UVA che UVB. Le etichette che affermano che i filtri solari sono "impermeabili" e "a prova di sudore" non sono consentite dalla legge poiché queste affermazioni enfatizzano eccessivamente l'efficacia del prodotto. Se un prodotto, inoltre, dichiara di essere resistente all'acqua, l'etichetta deve indicare chiaramente la durata dell'efficacia (ad esempio, 40 minuti o 80 minuti) durante attività come il nuoto.

La riapplicazione per una migliore efficacia deve essere menzionata sull'etichetta e i produttori non sono autorizzati a rivendicare una protezione solare che duri più di due ore senza riapplicazione.

Nel 2019, la FDA ha emesso una proposta di regolamento sui filtri solari, che proponeva di rivedere i requisiti per i principi attivi dei filtri solari, livelli massimi di fattore di protezione solare (SPF), requisiti ad ampio spettro (protezione contro i raggi ultravioletti A e B) e forme di dosaggio (ad esempio crema, lozione o spray) tra le altre cose. La norma proposta includeva anche aggiornamenti su come vengono etichettati i filtri solari per rendere più facile per i consumatori identificare le informazioni chiave.

L'annuncio è stato significativo perché le linee guida della FDA per i filtri solari non sono state aggiornate da diversi decenni.

La proposta del 2019 mirava ad aggiornare le creme solari con le ultime novità scientifiche, comprese nuove informazioni che dimostrano che alcuni ingredienti della protezione solare possono essere assorbiti attraverso la pelle nel corpo.

L'obiettivo era aggiornare le creme solari da banco (OTC) con le ultime ricerche scientifiche per garantire l'accesso ai metodi più efficaci di protezione della pelle.

La proposta si è concentrata sul garantire che i filtri solari fossero designati come GRASE (generalmente riconosciuto come sicuro ed efficace).

La FDA ha anche proposto che il livello massimo del fattore di protezione solare (SPG) aumenti da 50+ a 60+ per offrire la migliore protezione. È stato inoltre

specificato che i filtri solari con SPF di 15 o superiore devono avere una protezione ad ampio spettro.

La FDA afferma che le etichette dovrebbero essere più chiare per i consumatori, identificando informazioni, come ingredienti attivi, sulla parte anteriore della confezione per rendere i filtri solari più simili ad altri farmaci da banco.

Si suggerisce inoltre che queste etichette includano una notifica di un avviso di cancro della pelle e invecchiamento della pelle per i prodotti che non hanno dimostrato di prevenire il cancro della pelle (<https://www.fda.gov/drugs>).

### *Linee guida dell'UE*

Secondo il regolamento europeo sui cosmetici (CE) n. 1223/2009, i prodotti per la protezione solare sono classificati come prodotti cosmetici definiti come: *“qualsiasi preparato (come creme, oli, gel, spray) destinato ad essere posto a contatto con la pelle dell'uomo al fine esclusivamente o principalmente di proteggerla dai raggi UV assorbendo, disperdendo o riflettendo le radiazioni”*.

Attualmente vi sono 31 filtri UV consentiti per l'uso nei prodotti cosmetici, inclusi 4 filtri UV di dimensioni nanometriche (Regolamento (CE) n. 2019/680).

Nel 2006 la Commissione Europea ha pubblicato la 'Raccomandazione sull'efficacia dei prodotti per la protezione solare e le dichiarazioni ad essi relative' (2006/674/CE), che stabilisce le regole di base per l'etichettatura, le indicazioni e l'efficacia dei prodotti per la protezione solare.

Sebbene la direttiva sui cosmetici e diverse metodologie di test menzionate nella raccomandazione per la convalida delle dichiarazioni SPF e UVA siano state sostituite, i principi fondamentali della raccomandazione continuano a essere seguiti come standard del settore nel Regno Unito e nell'UE.

Secondo tale raccomandazione:

- I filtri solari dovrebbero essere efficaci contro i raggi ultravioletti A (UVA) e ultravioletti B (UVB).
- I filtri solari dovrebbero essere chiaramente etichettati con il fattore di protezione solare (SPF) e una descrizione del livello di protezione che forniscono (basso, medio, alto o molto alto) sulla stessa etichetta.

- Gli standard minimi di efficacia includono la protezione UVC di SPF 6, la protezione UVA di un terzo dell'SPF e una lunghezza d'onda critica di 370 nm per una protezione ad ampio spettro (la lunghezza d'onda critica è la lunghezza d'onda alla quale la crema solare consente al 10% dei raggi di penetrare. Una crema solare con una lunghezza d'onda critica superiore a 370 nm è considerata dalla FDA per fornire un'eccellente protezione dai raggi UVA).
- Non ci dovrebbe essere alcuna pretesa (sotto forma di testo, nome, marchio, immagine, figurativo o altro simbolo) che i prodotti abbiano qualità o funzioni che non hanno.
- Nessun reclamo dovrebbe implicare che il prodotto non richieda mai la riapplicazione (come "protezione per tutto il giorno"). Ciò non implica in alcun modo che i prodotti a lunga durata siano vietati. Tuttavia, le etichette per i filtri solari a lunga durata dovrebbero includere quanto usare all'inizio, quando riapplicare (ad esempio dopo aver sudato molto, dopo aver nuotato o essersi asciugati) e con quale frequenza.
- Le creme solari dovrebbero avere etichette che indichino i potenziali pericoli e forniscano consigli sulla sicurezza per usarle correttamente.
- Per valutare la protezione e la fotodegradazione dovrebbero essere utilizzate procedure di test standardizzate e riproducibili. I metodi *in vitro* dovrebbero essere preferiti rispetto ai metodi *in vivo*, che presentano problemi etici.
- La protezione UVB deve essere testata in vivo per determinare l'SPF (ad esempio, ISO 24444:2010). Per la protezione dai raggi UVA esistono due metodi di prova riconosciuti: *in vivo* (es. ISO 2332:2011) e *in vitro* (es. ISO 24443:2012).
- La protezione dall'immersione deve anche essere testata per le dichiarazioni di resistenza all'acqua.

In seguito, sono stati pubblicati i seguenti standard:

- EN ISO 2443:2021 – Determinazione della fotoprotezione UVA dei filtri solari *in vitro*;

- EN ISO 24444:2020 – Metodi di prova per la protezione solare – Determinazione *in vivo* del fattore di protezione solare (SPF).

Il 7 luglio 2022 la Commissione europea ha pubblicato il regolamento (UE) 2022/1176, che stabilisce nuove limitazioni per il benzofenone-3 e l'octocrilene. L'emendamento riduce la concentrazione consentita di benzofenone-3 nei prodotti cosmetici, comprese creme per il corpo. A partire dal 28 gennaio 2023, solo i cosmetici che soddisfano i nuovi requisiti potranno essere venduti nell'UE. Tuttavia, i produttori hanno tempo fino al 28 luglio 2023 per commercializzare i filtri solari che sono stati introdotti nel mercato dell'UE in conformità con le normative precedenti

#### 4.5 Composizione di una protezione solare

Le tre categorie di componenti principali richieste nei filtri solari sono filtri UV, emollienti ed emulsionanti; i componenti secondari sono fotostabilizzatori, formatori di pellicola, booster e potenziatori sensoriali (figura 23).

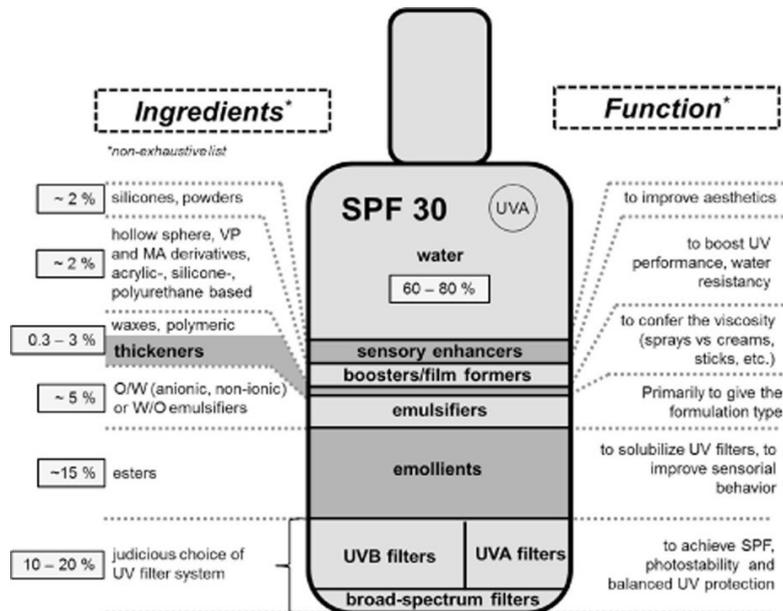


Figura 23: Schema che raffigura la composizione di una crema solare

I principi attivi fondamentali necessari per ottenere la protezione dai raggi UV sono inevitabilmente i *filtri UV*.

Una sapiente combinazione dei filtri UV consente di ottenere un'elevata performance di protezione dai raggi UV pur mantenendo una gradevole estetica della formulazione.

Oltre ai filtri UV, gli *emollienti* sono componenti chiave nei filtri solari. Svolgono un triplice ruolo, che include proprietà solubilizzanti, fotostabilizzanti e di potenziamento sensoriale.

Alcuni emollienti hanno anche dimostrato di aiutare nella fotostabilizzazione dei filtri UV fotoinstabili, in particolare l'avobenzone (BMDBM), che, come già precedentemente spiegato (vedi paragrafo 4.2) subisce un processo di degradazione molecolare quando sottoposto a irradiazione UV (Osterwalder, 2014). Questi fotostabilizzanti sono sostanze che agiscono da quencher, in modo da evitare la fotodegradazione della molecola. Esempi di tali composti includono etilesil metossicrilene, dietilesil 2,6-naftalato, butiloctil salicilato, tridecil salicilato, poliestere-8, e dietilesil siringilidene malonato.

Infine, gli emollienti hanno anche un forte impatto sulla sensazione della pelle in termini di facilità di stesura, untuosità e appiccicosità.

Il sistema emulsionante definisce il tipo di *emulsione*, il sistema olio-in-acqua (O/W) o acqua-in-olio (W/O). In generale, i sistemi O/W sono preferiti per la loro diffusione più facile e la sensazione di pelle meno unta.

Possono essere anche aggiunti *potenziatori sensoriali* per creare una formulazione esteticamente accattivante. Queste sostanze sono principalmente polveri o fluidi siliconici che mirano a migliorare la diffusione e a ridurre l'adesività e l'untuosità. A seconda della dimensione e della forma delle particelle, le polveri possono assorbire olio, facilitare la spalmabilità, fornire una finitura opaca, ridurre l'appiccicosità o conferire un tocco vellutato.

Gli *antiossidanti* sono frequentemente utilizzati nelle formulazioni solari per integrare la fotoprotezione del filtro UV prevenendo o riducendo i danni dei ROS generati dall'irradiazione solare.

#### **4.6 Effetti dannosi e tossici di alcuni filtri solari**

Nonostante sia importantissimo proteggere la nostra pelle dalle radiazioni UV usando le creme solari, che sono necessarie quindi per proteggersi dall'esposizione al sole, recentemente però sono emersi che i filtri solari hanno anche effetti collaterali, riscontrabili non solo nella salute umana, ma anche nell'ecosistema marino.

In particolare, i filtri ultravioletti organici hanno attirato molta attenzione negli ultimi anni. Alcuni dei filtri solari più utilizzati a livello mondiale, quali il benzofenone-3 (ossibenzone, BP3) (Figura 23), OMC e BMDBM sono stati ampiamente rilevati nelle acque reflue e nelle matrici ambientali (Glanz, 2022).

##### Benzofenone-3

Gli esseri umani sono esposti ai benzofenoni (figura 24) principalmente attraverso l'assorbimento cutaneo in seguito all'uso topico di prodotti contenenti questo composto. Studi di biomonitoraggio hanno indicato la presenza di tale sostanza in vari campioni biologici umani, come urina, sangue, latte materno, placenta umana e liquido amniotico (Mao, 2022). L'uso estensivo di prodotti contenenti benzofenoni ha suscitato preoccupazioni per quanto riguarda i rischi posti, portando diversi ricercatori a rivedere la loro presenza e tossicità.

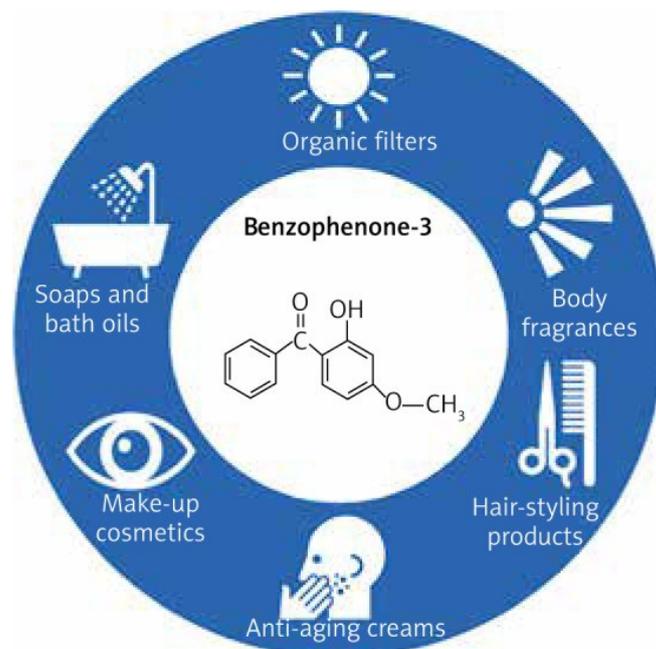


Figura 24: Esempi di prodotti contenenti il benzofenone-3

Nel regolamento del Parlamento europeo del 2017, una dose accettabile di BP-3 è stata ridotta dal 10% al 6% nei filtri UV (Commission regulation EU 2017/238), mentre negli Stati Uniti, Giappone e Corea del Sud, il suo contenuto è limitato al 5% a causa del sospetto di effetti nocivi (Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use, in Federal Register, Food and Drug Administration).

I dati ottenuti dai modelli di organismi viventi suggeriscono che il benzofenone-3 può generare stress ossidativo, non solo su organismi modello come *Danio rerio* (zebrafish), dove si è visto che induce la produzione di radicali liberi e modifiche a carico degli enzimi antiossidanti (Rodriguez-Fuentes, 2015) e nelle cellule vegetali superiori, portando ad un'alterazione del normale metabolismo delle piante, con inibizione della fotosintesi e respirazione, limitazione della sintesi dei carboidrati e persino alla morte (Zhong, 2019), ma anche negli organismi superiori.

Ad esempio, nelle femmine di ratto, si è visto un aumento della perossidazione lipidica e una diminuzione dell'attività antiossidante nella corteccia frontale e nell'ippocampo (Skorkowska, 2020), strutture selezionate perché considerate le più vulnerabili ai danni e con coinvolgimento nei processi cognitivi.

I filtri UV dovrebbero agire solo sulla superficie della pelle e non penetrare nel derma, tuttavia, la molecola di BP-3 è abbastanza piccola da penetrare attraverso di essa. Dopo l'applicazione topica, BP-3 può entrare nello strato corneo attraverso le lamine intercellulari o per diffusione passiva e quindi raggiungere il sangue (Fediuk, 2010).

L'effetto dannoso del BP-3 può alterare la funzionalità di molti tessuti e organi del corpo umano, come: pelle, reni, cervello, sistema endocrino ed ematologico, organi riproduttivi e sviluppo neonatale durante la gravidanza.

#### *Danni a carico della pelle*

Per molti anni si è creduto che il BP-3, usato come filtro chimico UV nelle creme solari, potesse avere solo effetti negativi sulla pelle. La dermatite allergica da contatto a BP-3 è stata notata per la prima volta nel 1972.

Sono state anche segnalate rare situazioni in cui l'esposizione alla protezione solare con BP-3 applicata su tutto il corpo ha causato anafilassi o una reazione anafilattoide (Tawfik, 2019). Inoltre, BP-3 ha mostrato alti tassi di reattività crociata con un altro principio attivo per la protezione solare, l'octocrilene, così come con il ketoprofene, un farmaco antinfiammatorio non steroideo comunemente usato (Heurung, 2014).

#### *Danni a carico di organi riproduttivi*

Alcuni filtri UV chimici, incluso BP-3, possono alterare la via di segnalazione del  $Ca^{2+}$  che controlla importanti meccanismi negli spermatozoi, come la chemotassi, la motilità, la capacitazione e la reazione acrosomiale, portando ad una ridotta fertilità maschile (Rehfeld, 2016). I dati ottenuti da studi sull'uomo non rilevano l'associazione tra esposizione a BP-3 e infertilità, sebbene tale relazione sia stata osservata per BP-2 (Buck, 2014), anche se tuttavia, uno studio epidemiologico ha fornito prove di una relazione tra l'esposizione a BP-3 e la frequenza dell'endometriosi diagnosticata (Kunisue, 2012).

### *Danni a carico del sistema endocrino*

I benzofenoni appartengono al gruppo di sostanze definite come sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (EDC), perché hanno un'affinità per i recettori degli ormoni steroidei e possono interferire con la funzione gonadica. BP-3 è stato anche frequentemente segnalato come un fattore che gioca un ruolo chiave nell'interruzione del sistema endocrino. Questo composto si è rivelato un forte attivatore dei recettori degli estrogeni umani (ER), sottotipi sia  $\alpha$  che  $\beta$  (membri della famiglia dei recettori nucleari) nel sistema *in vitro* ed è risultato essere antagonista verso i recettori degli androgeni e del progesterone.

Oltre al sistema riproduttivo, c'è anche un'ambiguità per l'impatto della BP-3 sull'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (HPT); mentre secondo un gruppo di ricerca, l'aumento della BP-3 urinaria materna ha comportato una diminuzione del 3% della triiodotironina libera (T3), ma l'ormone stimolante la tiroide (TSH) e la tiroxina (T4) sono rimasti invariati nel sangue delle donne in gravidanza (Aker, 2016), un altro studio ha invece dimostrato la presenza di ossibenzone nelle urine delle madri senza tuttavia aver alcun impatto sui loro livelli di T3 e T4 (Krause, 2018).

### *Neurotossicità*

I dati provenienti da studi epidemiologici e su animali hanno suggerito una relazione tra l'esposizione a fattori ambientali dannosi nella prima infanzia e il rischio di malattie neurodegenerative nell'età adulta. Non ci sono ancora dati sufficienti sull'impatto del BP-3 sul sistema nervoso umano, ma il fatto che BP-3 possa attraversare la barriera ematoencefalica, ha portato ad esaminare il suo ipotetico effetto neurotossico. Si è dimostrato che questo composto è in grado di inibire l'autofagia e disturbare lo stato epigenetico di colture cellulari neuronali primarie mediante l'inibizione della metilazione globale del DNA, nonché la riduzione dell'attività dell'istone deacetilasi (HDAC) e dell'istone acetil transferasi (HAT). L'ipometilazione globale del DNA e la ridotta attività degli enzimi correlati a questo processo suggeriscono l'instabilità cromosomica e il pattern di espressione genica inappropriato, portando ad un aumentato rischio di disturbi dello sviluppo neurologico o degenerazioni del sistema nervoso (Wnuk, 2018).

Studi recenti, hanno anche confermato cambiamenti proapoptotici, aumento dello stress ossidativo associato alla riduzione della capacità antiossidante e aumento del livello di glutammato extracellulare nella corteccia frontale e nell'ippocampo del maschio di ratto. Tuttavia, quando si studiava la progenie femminile, la stessa esposizione a BP-3 ha comportato una minore concentrazione di BP-3 in entrambe le parti esaminate del cervello rispetto ai discendenti maschi e non ha indotto il processo apoptotico.

Questi risultati suggeriscono che gli effetti neuronali della BP-3 possono dipendere dall'età e dal sesso, poiché le femmine metabolizzano questo composto più velocemente dei maschi.

Poiché la conoscenza dell'impatto di BP-3 sul sistema nervoso nei bambini è trascurabile, i risultati ottenuti dai diversi studi, forniscono il primo sospetto che l'esposizione a BP-3, specialmente durante il periodo di sviluppo embrionale, possa comportare un aumento del rischio di malattie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson, l'Alzheimer o l'Huntington in futuro (Wnuk, 2022).

Si può concludere che gli effetti negativi che possono essere indotti da BP-3 sulla salute umana, non possono essere dichiarati chiaramente a causa di un numero insufficiente di studi eseguiti. Al giorno d'oggi, vengono condotte sempre più ricerche sulla nocività di BP-3 sugli animali. Queste ricerche mostrano che BP-3 può esercitare alcuni effetti negativi sulla salute. Il problema è che i filtri chimici sono quasi sempre utilizzati in miscela. Sebbene la quantità dei singoli composti possa essere piccola, i loro effetti sono poco conosciuti. Inoltre, la stessa sostanza può essere trovata in più di un prodotto, il che crea un'opportunità di "effetto additivo" e non è possibile prevederne l'impatto negativo complessivo sulla salute umana.

#### *Danneggiamento dell'ecosistema marino*

Oltre che alla salute umana, però il BP-3 può portare a conseguenze negative anche in tutto l'ecosistema marino. Negli ultimi anni, infatti, i prodotti per la protezione solare e i loro principi attivi, i filtri ultravioletti (UV), tra cui il BP-3, hanno attirato l'attenzione scientifica e pubblica, poiché possono anche avere un impatto sulla salute dei coralli su scala locale a causa del loro rilascio diretto nelle aree marine costiere attraverso attività ricreative e fognature, contribuendo al fenomeno detto

‘sbiancamento dei coralli’ (Danovaro, 2008) (figura 25), che consiste nella rottura della simbiosi tra i polipi di corallo e le alghe unicellulari simbiotiche chiamate zooxantelle (*Symbiodinium* spp), un fenomeno che si manifesta con la perdita di pigmentazione dei coralli. Il colore dei coralli è infatti dovuto, nella maggior parte dei casi, proprio ai pigmenti fotosintetici presenti nelle cellule di *Symbiodinium*, in quanto i tessuti dell’animale presentano una colorazione molto tenue, quasi trasparente. Una volta che le zooxantelle hanno lasciato l’animale, dunque, i polipi non possono che lasciar trasparire il bianco candido del loro scheletro sottostante e il pallore delle loro cellule. Diversi studi hanno dimostrato una maggiore mortalità dei coralli, dopo l’esposizione ai vari filtri UV ampiamente utilizzati (Danovaro, 2008; (Corinaldesi, 2018; Downs, 2014).

Essendo quindi il BP-3 tossico per le alghe simbiotiche che vivono all'interno dei coralli (che svolgono funzioni vitali per i polipi dei coralli), ne ostacola la crescita.

Si ritiene, inoltre, che il BP-3 danneggi il DNA del corallo, causi deformità e avvii un'interruzione del sistema endocrino (interferendo con i sistemi ormonali) e renda, come già detto, il corallo più suscettibile allo sbiancamento.



*Figura 25: Fenomeno dello sbiancamento dei coralli*

La maggior parte degli studi finora condotti ha studiato la tossicità correlata alla sostanza del filtro UV sui coralli adulti, mentre solo pochi hanno considerato lo stadio larvale. È noto che le prime fasi della vita (cioè larve di planula, prime reclute post-insediamento) siano generalmente più sensibili ai fattori di stress ambientale e agli inquinanti chimici, rispetto alla fase dell'adulto. Pertanto, lo stress che si manifesta nelle prime fasi della vita può portare a gravi impatti strutturali sulle popolazioni e sulle comunità (Miller, 2022).

L'identificazione e l'accumulo di BP-3 nelle acque causano preoccupazioni non solo ai coralli, ma anche a molte altre specie acquatiche, osservando che si accumula maggiormente nei pesci che nell'acqua (Di Nardo, 2017).

Nel complesso, l'inquinamento da filtri UV sembra avere effetti rilevanti *in vitro* e *in vivo* sul biota marino, ma le implicazioni a lungo termine di questi effetti sono ancora sconosciute.

Sulla base di questi studi, i responsabili politici in varie località (ad esempio, Hawaii, Isole Vergini americane, Palau, Aruba e Bonaire) hanno già intrapreso azioni normative e vietato l'uso di alcuni filtri UV organici tra cui BP-3, OMC, octocrilene, ottocrilene (OCR) e 4-metilbenzilidene canfora (4-MBC) nei filtri solari.

Per cercare di porre più attenzione a questo problema, si è introdotta la certificazione 'reef safe', ad indicare una crema solare che abbia determinati requisiti:

- Sia priva dei seguenti ingredienti, in quanto nocivi alla barriera corallina (BP-3, OMC, OCR, 4-MBC, derivati del PABA, omosalato e BMDBM)
- Privo di conservanti e additivi come parabeni, ftalati e triclosano
- Privo di nanomateriali
- I prodotti solari devono essere resistenti all'acqua

### BMDBM

Il butil metossidibenzoilmetano (BMDM) è un altro dei filtri organici presenti nelle formulazioni delle creme solari. Ha coefficienti di assorbimento molare eccezionalmente elevati, assorbe principalmente nella regione UVA con una lunghezza d'onda massima di 357 nm, ma come già accennato precedentemente,

subisce un tautomerismo cheto-enolico. È stato riscontrato che BMDM perde l'efficacia di assorbimento a causa di questa fotoisomerizzazione perché la forma cheto assorbe nell'intervallo UVC da 260 a 280 nm (Mturi, 2008).

BMDBM è stato rilevato in campioni d'acqua e sedimenti in tutto il mondo.

Di conseguenza, il BMDBM è presente anche in diversi organismi marini come pesci, invertebrati, barriere coralline, mammiferi marini e altre specie, a causa dell'elevato potenziale di bioaccumulo e biomagnificazione nelle reti alimentari acquatiche.

Considerando tutti questi effetti sul biota, può avere anche una ripercussione sugli esseri umani; infatti anche questo composto ha attività anti-androgena, anti-glucorticoide e anti-tiroide (Klopčič & Sollner, 2017) ed è stato già bandito in alcune regioni geografiche, così come il BP-3.

#### Biossido di Titanio e Ossido di Zinco

A causa dei rischi ecotossicologici dei filtri UV (UVF) organici, l'utilizzo di UVF inorganici per sostituirli, è diventato un argomento di interesse sia per i produttori che per i consumatori, a causa della loro protezione dall'ampio spettro UV, della penetrazione limitata della pelle e dei rischi per la salute. Recentemente sono sempre più inclusi in forma di nanoparticelle ( $\leq 100$  nm) (NPs) a causa dell'effetto protettivo UV relativamente più elevato e delle proprietà estetiche. Si ritiene che il 60% di nanoparticelle di  $\text{TiO}_2$  e l'80% di nanoparticelle di  $\text{ZnO}$  prodotto a livello globale, siano utilizzati nei prodotti cosmetici.

Con l'aumento della produzione e dell'applicazione, lo scarico di UVF inorganici negli ambienti è inevitabile. Ad oggi, gli studi hanno dimostrato che gli UVF inorganici sono stati rilevati in acque marine, sedimenti e organismi a concentrazioni crescenti.

Queste nanoparticelle sono spesso rivestite in superficie con uno o più strati di un altro materiale inorganico o organico, ovvero sono materiali compositi e quindi differiscono dalle nanoparticelle di biossido di titanio che possono essere naturalmente presenti nell'ambiente. Questo rivestimento serve a migliorare la loro stabilità, facilitare la loro incorporazione nei filtri solari e mitigare gli effetti fotocatalitici indesiderati (fototossicità) su cellule e organismi.

È probabile che queste differenze nel rivestimento/chimica della superficie, influiscano sul loro comportamento e destino nell'ambiente acquatico (ad es. agglomerazione e sedimentazione) e anche la loro interazione con gli epiteli di superficie degli organismi acquatici, e quindi il loro assorbimento, accumulo e tossicità (Martin, 2022).

## CAPITOLO 5

### NUOVE SOLUZIONI ALTERNATIVE A SALVAGUARDIA DELLA SALUTE E DELL'AMBIENTE

La preoccupazione per l'impatto negativo dei filtri UV sull'ambiente e sugli organismi cresce di giorno in giorno. La comunità di ricerca sta cercando di trovare alternative e soluzioni per ridurre al minimo i rischi posti da questi effettivi inquinanti emergenti. Negli ultimi decenni sono stati apportati numerosi miglioramenti ai filtri solari, con l'obiettivo in particolare di ottenere nuovi filtri UV con maggiore efficacia fotoprotettiva, fotostabilità, sicurezza ambientale e umana e proprietà sensoriali migliorate. A tal fine, l'attenzione della comunità scientifica si è rivolta nell'esplorare il mondo naturale, per trovare composti adeguati a poter ricoprire il ruolo dei filtri attualmente presenti in commercio.

Sono stati segnalati diversi estratti di organismi botanici e marini con effetti fotoprotettivi e antiossidanti. Inoltre, alcuni prodotti naturali isolati da queste fonti si sono rivelati composti bioattivi promettenti.

Gli organismi marini producono composti bioattivi con elevata complessità strutturale, a causa delle condizioni di stress a cui sono sottoposti, che gli permettono di far fronte alla notevole quantità di raggi UV a cui sono esposti quotidianamente. Alghe, cianobatteri, batteri e funghi marini sono solo alcuni esempi di organismi marini che producono metaboliti secondari con effetti fotoprotettivi (Pallela, 2010; Campanini Maciel, 2018).

Anche le piante sono esposte ai raggi UV; questo implica che si debbano proteggere dagli effetti negativi apportati da questi ultimi.

Come risultato di questa resistenza naturale, vengono prodotti metaboliti secondari, che possiedono proprietà fotoprotettive e antiossidanti UV, in particolare terpenoidi, antociani, flavonoidi, carotenoidi e acidi fenolici (Jesus, 2022).

I sottoprodotti del vino, ad esempio, come i semi d'uva, sono considerati una ricca fonte di antiossidanti, essendo la maggior parte di questi estratti costituiti da composti polifenolici, ovvero i flavonoidi ed è stato visto come gli estratti d'uva, con

le loro proprietà fotoprotettive, riescano a ripristinare le caratteristiche morfologiche dei fibroblasti della pelle danneggiati dai raggi UV (Yarovaya, 2020).

Come per il vino, anche i sottoprodotti dell'olio d'oliva, come le foglie di ulivo, prodotto di scarto della raccolta delle olive e della potatura degli ulivi, avendo un alto contenuto di polifenoli, potrebbero essere utilizzate per ricavare estratti da utilizzare come fotoprotezione (Da Silva, 2019).

### **5.1 L'Honeybush**

Oggi giorno sono quindi sempre di più studiati i diversi estratti e composti ricchi di polifenoli provenienti dalle piante di cui un esempio ne è l'Honeybush.

L'Honeybush (*Cyclopia spp.*) (famiglia Fabaceae, tribù Podalyrieae) è una pianta endemica del sud Africa, appartenente alla famiglia delle leguminose, nota alle popolazioni indigene per le sue innumerevoli proprietà benefiche per la salute e che negli ultimi anni sta riscuotendo un successo commerciale come tisana, impropriamente riferita come tè.

Oltre a questa specie, l'intero spettro dell'industria sudafricana delle tisane è composto dal Rooibos (*Aspalathus linearis*) e dal tè del bush o tè zulù (*Athrixia phylicoides*).

Le specie *Cyclopia* crescono abbastanza localizzate nei distretti costieri e nelle aree montuose delle province del Capo occidentale e orientale. Le principali specie attualmente di interesse commerciale sono *Cyclopia intermedia*, *Cyclopia subternata*, *Cyclopia sessiliflora* e *Cyclopia genistoides*.

È facilmente riconoscibile per il fusto legnoso, le foglie sottili e i bei fiori di colore giallo acceso (figura 26).



*Figura 26: Rappresentazione dei fiori dell'Honeybush*

### *Cenni storici ed industria del tè*

La prima catalogazione dell'Honeybush risale al 1705 da parte dei botanici inviati dalla Compagnia Olandese delle Indie Orientali, la quale si era stabilita in Sud Africa e aveva fondato Città del Capo come scalo e rifornimento per le navi che andavano in Asia. Non vi è alcuna descrizione, però, sull'uso come infuso da parte delle popolazioni indigene. Per avere le prime descrizioni sull'uso bisogna attendere l'invasione degli Inglesi, i quali diffondono le conoscenze del Sud Africa sia in Inghilterra che negli Stati Uniti. Infatti, una relazione del 1881 indica l'uso dell'Honeybush (*Cyclopia genistoides* è stata la prima specie *Cyclopia* ad essere usata come tisana e da allora sono state descritte più di 20 specie di questa pianta) come un "tè" (Honeybush tea) della Colonia del Capo del Sud Africa e ne specifica le proprietà medicamentose contro la tosse e altri sintomi delle vie respiratorie associati alle infezioni.

Negli anni '20 tutto l'Honeybush tea prodotto nella Penisola del Capo proveniva da *Cyclopia genistoides*, mentre nelle zone di Caledon (Overberg) e George veniva utilizzato *Cyclopia subternata* (Joubert,2008).

Nonostante la sua lunga storia di utilizzo, il tè Honeybush non ha mai raggiunto la stessa popolarità del rooibos come tisana e la domanda è rimasta sporadica all'inizio del XX secolo. Non ha avuto luogo alcuna commercializzazione attiva e

dopo la Seconda guerra mondiale, il consumo di tè Honeybush è diminuito al punto che la lavorazione è stata in gran parte interrotta.

Il primo prodotto di marca, confezionato con il nome "Caspa Cyclopia Tea" è apparso sul mercato negli anni '60.

Il successo commerciale del rooibos ha portato a un rinnovato interesse negli anni '90, quando il National Botanical Institute (Kirstenbosch) e l'Agricultural Research Council of South Africa (ARC) hanno guidato progetti sulla coltivazione commerciale, sulla lavorazione e sulle proprietà che promuovono la salute per gettare le basi per un'industria formale dell'honeybush.

La prima volta che questa pianta è stata raccolta da una piantagione commerciale è stato nel 1996. Nello stesso anno è stato sviluppato un metodo standardizzato per la lavorazione presso l'ARC e la Stellenbosch University e gli agricoltori su piccola scala ed emergenti sono stati coinvolti nel 1998.

L'industria ufficiale dell'Honeybush è emersa nel 1999 quando è stata costituita la South African Honeybush Producers Association (SAHPA), successivamente ribattezzata South African Honeybush Tea Association (SAHTA).

L'uso dell'honeybush è cambiato nel tempo, passando da uso terapeutico ad uso non medicinale, cioè di tisane bevute per divertimento; la situazione attuale però è cambiata riportando l'attenzione sulle proprietà curative di questa pianta.

L'uso moderno dell'Honeybush ha seguito l'esempio del rooibos (mercato più sviluppato dell'Honeybush) e in molti casi è gustato come un infuso preparato da una miscela di Honeybush e rooibos.

Più di 200 ettari sono attualmente coltivati (figura 27) in aree abbastanza localizzate che vanno dall'Overberg nella parte meridionale della Provincia del Capo Occidentale al Langkloof nella Provincia del Capo Orientale.



*Figura 27: Coltivazione e piantagione dell'Honeybush*

#### *Botanica*

Nel territorio naturale, i cespugli crescono normalmente fino a 1.5 m di altezza, ma possono raggiungere fino a 3 m, a seconda della specie (figura 28).



*Figura 28: Pianta dell'Honeybush*

La forma e le dimensioni delle foglie differiscono tra le specie: dalle specie pubescenti a foglia stretta a specie a foglia piatta. Le piante hanno steli legnosi, un rapporto relativamente basso tra foglie e steli e semi dal guscio duro.

Le foglie e i fiori trifogliati con calice frastagliato sono caratteristici del genere e queste ultime sono dotate di un colore giallo intenso; hanno un caratteristico aroma dolce, simile al miele (dal quale il nome 'honey') che ha attirato i primi consumatori di tisane.

I cespugli si trovano normalmente sui versanti meridionali ombrosi e più freschi delle catene montuose, ad eccezione della *Cyclopia genistoides* che si trova anche nelle zone pianeggianti e sabbiose costiere.

### *La raccolta dell'Honeybush*

Le parti che si utilizzano per la produzione dell'infuso di Honeybush (figura 29) sono le foglie ed i fiori che successivamente vengono lavorati fino ad ottenere il prodotto finale; in pratica vengono tagliati, ossidati e asciugati.

Gli arbusti vengono tagliati alla base per consentire successivamente una migliore raccolta e gli esemplari considerati migliori sono quelli che crescono in zone soggette ad incendi; infatti, questi arbusti presentano foglie e fiori più grandi e la qualità sembra essere superiore.

La pratica attuale consiste nel raccogliere il materiale vegetale dall'estate al tardo autunno prima che possa verificarsi la fioritura, poiché la fioritura mette la pianta sotto stress.

La fermentazione rotativa in lotti è un concetto sviluppato inizialmente per la fermentazione del rooibos (Joubert and Müller, 1997), ma adottato anche per l'Honeybush.

La fermentazione è un processo altamente controllato che incoraggia lo sviluppo di microbi per esaltare il sapore. Una volta tagliate le foglie di Honeybush, vengono poste in serbatoi di fermentazione che possono anche essere chiamati forni. I serbatoi di fermentazione consentono il monitoraggio dell'umidità e della temperatura per assicurarsi che l'ambiente sia perfetto. Il tè fermenta per circa per 60 ore a 70 °C o 80–85 °C per 18 ore. Il serbatoio viene ruotato più volte al giorno per garantire che le foglie entrino in contatto con l'ossigeno mentre fermentano.

Dopo 60 ore di fermentazione, le foglie vengono rimosse dai serbatoi per ossidarsi su letti di essiccazione all'interno o in serre climatizzate. Le foglie completamente fermentate iniziano con un colore a foglia verde e cambiano in un colore più rossastro.

La produzione commerciale di Honeybush non fermentato seguì subito dopo l'inizio della produzione di rooibos non fermentato. La maggior parte del tè in circolazione oggi non subisce il processo di fermentazione; viene raccolto e in seguito ossidato, processo durante il quale le foglie, venendo esposte all'ossigeno, liberano gli enzimi polifenolossidasi (PPO) i quali sono in grado di catalizzare la trasformazione di una serie di composti aromatici che hanno due gruppi fenolici adiacenti su di essi (Araji, 2014).

I polifenoli contenuti nelle foglie agiscono come substrato per gli enzimi polifenolossidasi, causando incolorimento.

Una volta raggiunto il livello di ossidazione ideale, il processo di ossidazione è terminato.



*Figura 29: Infuso di Honeybush*

### *Benefici e Proprietà*

Seppur privo di specifiche proprietà sedative, l'infuso di Honeybush trasmette una sensazione di relax, distensione e benessere. Essendo privo di teina e caffeina, il suo grosso vantaggio è quello di essere adatto per un consumo notturno per coloro che non vogliono assumere sostanze eccitanti.

Ha inoltre un basso contenuto di tannini, composti polifenolici presenti nelle piante, divisi in diverse classi in funzione della loro struttura chimica. Ha diverse proprietà:

- Migliora la salute delle ossa

L'infuso contiene molti minerali come il ferro, il calcio, il rame, il fosforo, il magnesio, il potassio, il sodio, il manganese; utile contro l'osteoporosi per l'alto contenuto di calcio.

- Allevia i sintomi respiratori

L'Honeybush contiene il pinitolo, uno zucchero modificato che si ritrova generalmente negli alberi di pino e nelle foglie di alcune leguminose. Si tratta di una sostanza dotata di proprietà espettoranti, perfetta contro la tosse e le malattie delle vie respiratorie.

- Ricco di antiossidanti

Essendo ricco di antiossidanti, composti vegetali che aiutano a prevenire o ridurre i danni cellulari causati dallo stress ossidativo, contrasta l'invecchiamento.

L'Honeybush è ricco di un gruppo di antiossidanti chiamati polifenoli, che comprendono xantoni, flavanoni, flavoni e benzofenoni. I tipi principali di xantoni contenuti nell'arbusto, sono la mangiferina e l'isomangiferina, mentre i flavanoni principali sono l'esperidina e isokuranetina.

Sia la mangiferina che l'esperidina sono attribuite a potenti effetti antinfiammatori e antitumorali.

- Può avere proprietà antitumorali

Gli antiossidanti presenti possono aiutare a distruggere le cellule cancerose, proteggere dalle tossine che promuovono il cancro e inibire lo sviluppo di alcuni tipi di cancro. Tra questi antiossidanti, la mangiferina sembra avere il più forte

potenziale antitumorale, poiché può inibire l'inizio, la promozione e la diffusione delle cellule tumorali (Marnewick, 2008).

- Può avere proprietà antidiabetiche

La ricerca sostiene che i polifenoli del tè Honeybush possano aiutare a prevenire, gestire e curare il diabete di tipo 2; la mangiferina può aiutare a ridurre i livelli di zuccheri nel sangue stimolando la secrezione di insulina e favorendo la rigenerazione delle cellule pancreatiche danneggiate (Olawale, 2018).

Per quanto riguarda l'esperidina, studi sugli animali suggeriscono che aiuta ad abbassare i livelli di zucchero nel sangue regolando gli enzimi chiave coinvolti nel metabolismo degli zuccheri, nonché proteggendo il pancreas dal danno ossidativo.

- Sollievo dai sintomi della menopausa

È anche utile nel trattamento dei sintomi della menopausa grazie al contenuto degli isoflavoni, classificati come fitoestrogeni, composti che imitano l'effetto dell'ormone femminile estrogeno nel corpo, e quindi possono aiutare ad alleviare i sintomi della menopausa (Olawale, 2018).

- Supporto del sistema immunitario

La mangiferina può aumentare l'attività dei macrofagi, un tipo di globuli bianchi coinvolti nell'eliminazione di corpi estranei (McKay, 2007).

- Fotoprotezione

Vi sono numerosi studi che indicano il potenziale fotoprotettivo da parte di estratti polifenolici, come esperidina e mangiferina, in grado quindi di proteggere la pelle dalla radiazione ultravioletta, contribuendo a ridurre gli effetti dannosi e in definitiva a prevenire la cancerogenesi e l'invecchiamento dovuti all'esposizione cronica ai raggi UV (Petrova, 2011).

## MATERIALI E METODI

### 6.1 Estratti provenienti da *Cyclopia Genistoides*

Gli estratti di honeybush testati sono stati ottenuti dalla specie *Cyclopia genistoides* attraverso processi di filtrazione e ultra-filtrazione (figura 31) (Miller, 2020), gentilmente forniti dalla Prof. Elizabeth Joubert della African Research Council (Stellenbosch, Sud Africa) e comprendono:

1. ARCOP26: C- $\beta$ -D-Glucopiranosil-4-O- $\beta$ -D-glucopiranosiliriflofenone (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>) (figura 30) è uno dei maggiori benzofenoni in *C. genistoides*. Questo composto è stato isolato da *C. genistoides* utilizzando l'estrazione in fase solida (SPE) per arricchire l'estratto, seguita da purificazione mediante cromatografia liquida semipreparativa (LC) (Beelders, 2014).

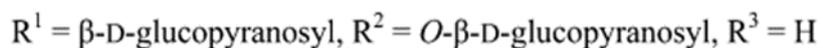
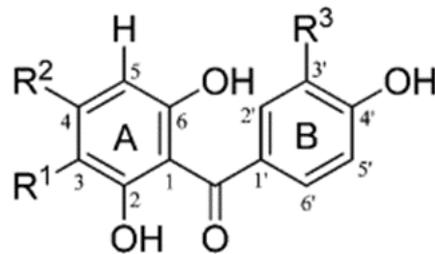


Figura 30 : Struttura chimica di ARCOP26

2. ARC2028: è il permeato proveniente da un ultra-filtrato di un estratto di *Cyclopia genistoides*. L'ultra-filtrazione è stata eseguita per purificare l'estratto con etanolo al 40%, con l'obiettivo di arricchire il contenuto di xantoni e benzofenoni.
3. BEF1: è una frazione arricchita di benzofenoni, ottenuta quando il retentato dell'ultrafiltrato dell'estratto di *C. genistoides*, viene frazionato mediante cromatografia con resina macroporosa.

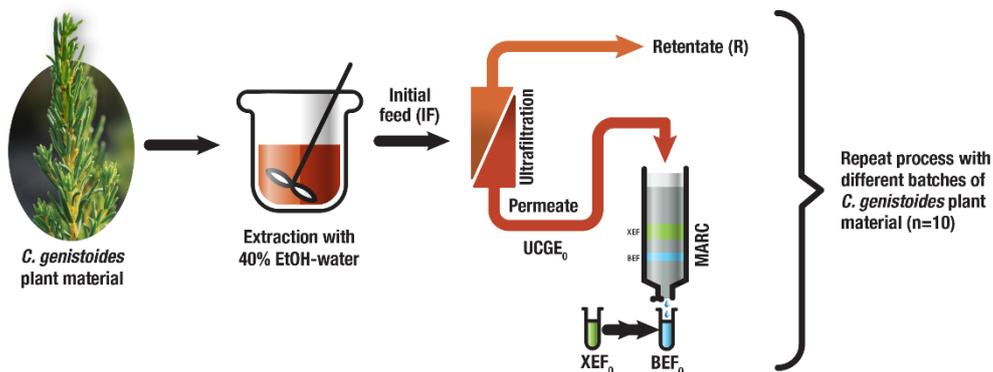


Figura 31: Processo di estrazione per ottenere i composti provenienti da *C. genistoides* (Miller, 2020)

## 6.2 Determinazione degli spettri di assorbanza dei diversi estratti

La spettrofotometria è una tecnica che si basa su la misurazione dell'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche monocromatiche del campo del visibile e dell'UV da parte di molecole. Permette quindi di misurare la frazione di radiazione elettromagnetica assorbita in funzione della sua lunghezza d'onda.

I tre estratti (ARCOP26, ARC2028 e BEF1) (figura 32) provenienti da *Cyclopia genistoides* sono stata sottoposti ad un'analisi spettrofotometrica per verificare la loro effettiva assorbanza nella regione UVA (320-400 nm).



Figura 32: Estratti di *Cyclopia genistoides*

Come confronto sono stati usati dei filtri UV commerciali spesso utilizzati nelle formulazioni delle creme solari, come BMDDBM, il filtro UVA più popolare e noto per essere fotoinstabile, e il BP-3, per avere un paragone con ARCOP26, un benzofenone naturale.

I vari estratti sono stati pesati in eppendorf da 1.5 mL e sciolti in diverse percentuali di etanolo (EtOH). Per quanto riguarda ARCOP26 questo è stato disciolto in 100% EtOH, arrivando ad avere una concentrazione di 10 mM, mentre gli altri due estratti (4 mg/mL) sono stati disciolti in una soluzione 1:1 di EtOH/PBS (PBS = tampone fosfato salino, pH 7.4). Questa scelta è stata fatta per cercare di solubilizzare al meglio le varie sostanze nel solvente prescelto al fine di ottenere una soluzione omogenea e trasparente.

Dopo aver preparato queste soluzioni madri (stock) degli estratti, è stata allestita una piastra multi-well da 96 con fondo trasparente agli UV, in cui gli estratti precedentemente preparati sono stati ulteriormente diluiti in diverse percentuali di EtOH (1%, 10%, 25%, 50%, 100%), per andare a vedere come cambiava lo spettro in funzione del diverso rapporto tra EtOH e PBS.

In pratica in ogni well è stato posto un volume finale di 200  $\mu$ L, in cui quello che cambiava era il rapporto tra EtOH/PBS, in modo da avere una concentrazione finale di 100  $\mu$ M per ARCP26 e di 0.1 mg/mL per ARC2028 e BEF1.

Il BMDDBM e il BP-3 sono stati disciolti come ARCOP26 in EtOH per avere nella stock una concentrazione di 10 mM e nel pozzetto una concentrazione finale di 100  $\mu$ M.

I composti sono poi stati analizzati inserendo la multi-well in un lettore di micropiastre (BIO-TEK Synergy HT), precedentemente settato per un range di lunghezza d'onda appropriato (260-500 nm), in modo da ottenere i diversi spettri di assorbanza di tutti i composti.

### 6.3 Fotostabilità dei diversi estratti dopo esposizione ad UVA

Dopo aver determinato lo spettro di assorbimento dei filtri, si è proseguito andando a determinare la fotostabilità, caratteristica fondamentale per un filtro UV.

L'irraggiamento dei filtri con raggi UVA è stato effettuato mediante una lampada solare abbronzante commerciale, Philips Original Home Solarium (modello 80 406/A; Philips, Groningen, Olanda, dotata di bulbo Philips HPA, Uv tipo 3) (figura 33), erogante un flusso di 45 mW/cm<sup>2</sup> tra 300 e 400 nm.



*Figura 33: Lampada UVA utilizzata per irraggiare i vari campioni e come viene disposta durante gli esperimenti*

Anche in questo caso è stata usata una piastra multi-well da 96 allestita come nel procedimento precedente, andando però ad utilizzare solo la percentuale di EtOH scelta (1%) per i tre estratti.

La lampada è stata poggiata in posizione orizzontale su un supporto apposito, tale da poter irraggiare i campioni dall'alto ad una distanza di 20 cm dalla sorgente luminosa. Sotto di essa è stata posta la piastra multi-well su cui è stato adagiato sopra una lastra di quarzo, in modo da non schermare il passaggio dei raggi UV, ma allo stesso tempo impedire l'evaporazione delle varie soluzioni.

Sono stati testati differenti tempi di esposizione ai raggi UVA: 0, 5, 10, 15, 20 minuti.

La procedura è stata eseguita sulla stessa piastra andando a schermare con un cartoncino nero i campioni in modo da permettere la giusta esposizione ai tempi diversi.

Dopo irraggiamento, la piastra è stata posta nel lettore di micropiastre e sono stati misurati i vari spettri di assorbimento.

Come controllo positivo è stato usato anche in questo caso il BMDBM.

#### **6.4 Saggi per la determinazione del danno fotoindotto su macromolecole biologiche**

Successivamente gli estratti di Honeybush sono stati usati per andare a studiare la loro eventuale azione fotoprotettiva su diverse macromolecole biologiche, come lipidi (sottoforma di liposomi) e proteine. Oltre a testare gli estratti, come confronto nei diversi saggi sono stati usati filtri commerciali come il BMDBM e il BP-3.

ARCP26, ARCO2028 e BEF1 sono stati testati sia a contatto con le macromolecole biologiche per misurare l'efficacia protettiva contro il danno ossidativo indotto dai raggi UVA, che non in contatto per misurare la capacità schermante dai raggi UVA.

##### 6.4.1 Preparazione di Liposomi

I liposomi costituiscono dei sistemi lipidici (composti da colesterolo e fosfolipidi come la fosfatidilcolina e il diacetilfosfato), particolarmente interessanti perché hanno struttura e composizione molto simili a quelle delle membrane cellulari per cui possono essere usati come sistemi modello.

Nello specifico è stata usata una soluzione di fosfatidilcolina (PC) in cloroformio (100 mg/mL) della SIGMA (P2772). Per ogni campione, in una provetta di vetro sono stati messi 10  $\mu$ L di PC, a cui sono stati aggiunti ulteriori 10  $\mu$ L di cloroformio.

La soluzione di lipide è stata posta sotto flusso di azoto ( $N_2$ ) per far evaporare il solvente in maniera da ottenere un film lipidico sulle pareti della provetta.

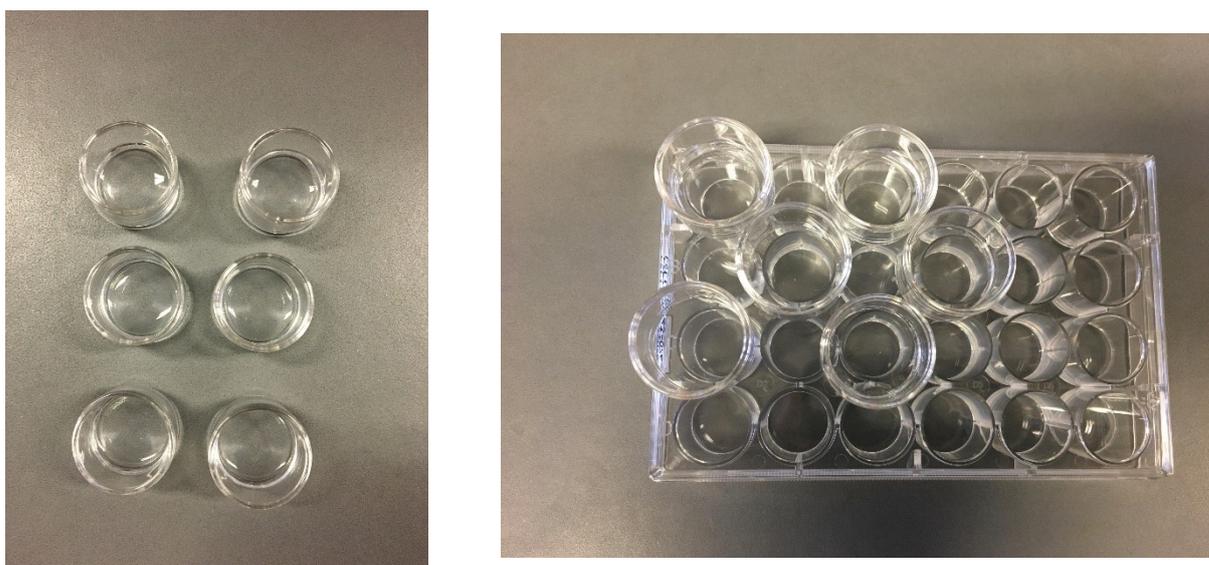
Tutto questo procedimento va svolto in ghiaccio ed al buio. Una volta ottenuto il film lipidico si procede aggiungendo 750  $\mu$ L di tampone fosfato 5 mM (0.9% NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) ad ogni campione, vortexando poi il tutto per 2 minuti in modo

da disciogliere il film lipidico nel mezzo acquoso per ottenere una sospensione di liposomi omogenea e di aspetto lattescente.

#### 6.4.2 Preparazione dei Campioni

Dopo aver preparato i liposomi di PC, si procede a testare la fotoprotezione dei campioni in esame.

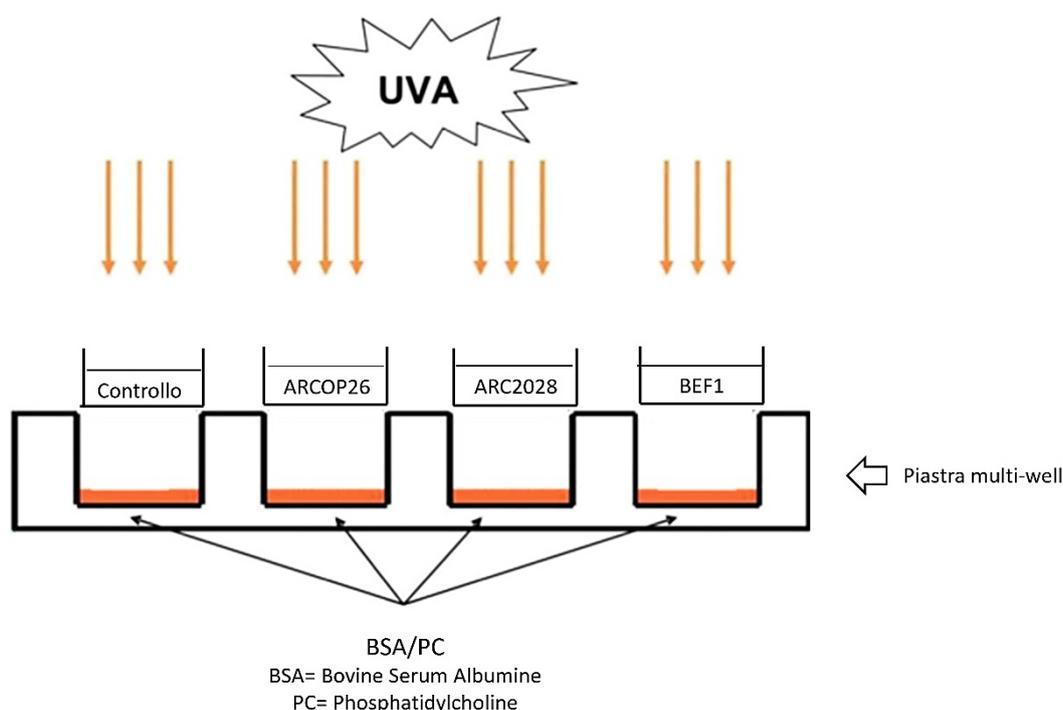
Per poter verificare se gli estratti di Honeybush schermano i raggi UVA, 500  $\mu$ L di ogni campione alla stessa concentrazione finale descritta nel paragrafo 6.2, vengono messi in dei beckerini con fondo di quarzo (*figura 34*), dello stesso diametro dei pozzetti di una piastra multiwell da 24. I beckerini vengono poi posti al di sopra di una piastra multiwell da 24 contenente ognuno 700  $\mu$ L di soluzione liposomiale.



*Figura 34: A sx i becker con fondo di quarzo utilizzati per testare i filtri; a dx la disposizione dei becker nella piastra multi-well per andare a testare i filtri come agenti schermanti*

### 6.4.3 Irraggiamento UVA

Una volta allestita la piastra contenente i liposomi nei pozzetti, sopra la quale sono posti i becker contenenti gli estratti o filtri solari, questa viene posta ad irraggiamento come descritto nella sezione 6.3 (figura 35).



*Figura 35: Schema di irraggiamento utilizzando becker di quarzo con controllo (EtOH/PBS) ed estratti/filtri. Al di sotto è presente la piastra multi-well con il campione da irraggiare (BSA o PC).*

Come controllo positivo, ovvero il campione irraggiato in assenza di estratti o filtri solari, vengono usati 500  $\mu$ L della soluzione acquosa di EtOH/PBS al 1%.

La piastra così allestita viene irraggiata per una durata complessiva di 20 minuti, tempo scelto in base al time-course effettuato (riportato nella sezione 6.3), dove la differenza di ossidazione lipidica tra il campione irraggiato e non, era ben apprezzabile. Come controllo negativo (campione non irraggiato), 700  $\mu$ L di soluzione liposomiale vengono lasciati in ghiaccio al buio.

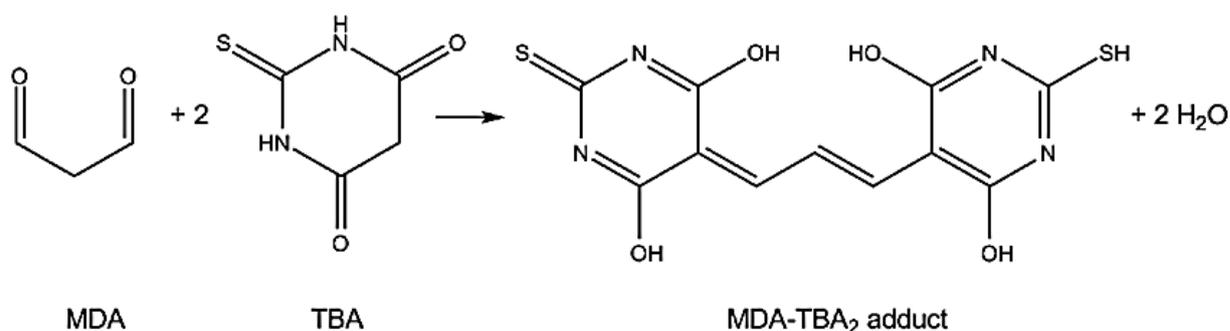
Dopo irraggiamento, vengono prelevati 600  $\mu\text{L}$  di liposomi da ogni pozzetto e anche dal campione non irraggiato e trasferiti all'interno di provette di vetro (precedentemente etichettate). A seguito di questa procedura, si prosegue poi con il saggio per valutare il livello di perossidazione lipidica subita nei liposomi.

### 6.5 Saggio per la Perossidazione Lipidica (TBARS)

La misura dei TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) costituisce un saggio usato per il monitoraggio della perossidazione lipidica, indice di stress ossidativo (Buege, 1978).

Infatti, gli acidi grassi costituenti i fosfolipidi delle membrane cellulari, sottoposti ad una fonte di stress ossidativo, subiscono una serie di reazioni a catena che ne modificano la struttura chimica fino alla degradazione con formazione di composti carbonilici come la malondialdeide (MDA) (descritta nel paragrafo 2.3.2).

Il saggio permette di misurare la quantità di MDA o di composti analoghi che si formano durante la perossidazione e che, reagendo con l'acido tiobarbiturico (TBA) in ambiente acido ed a  $90^\circ\text{C}$ , formano un composto rosa e fluorescente che sarà rilevabile a 535 nm attraverso analisi spettrofotometrica (Figura 36).



*Figura 36: Reazione che porta alla formazione dell'addotto rosa durante il saggio TBARS*

Ad ogni campione vengono aggiunti 2 mL di reattivo TBA/TCA/HCl (acido tricloroacetico/acido tiobarbiturico/acido cloridrico) costituito da:

- TCA 15% (Sigma)
- TBA 0.375% (Sigma)
- HCl 0.2 M

Dopo aver aggiunto il reattivo in ogni provetta e aver vortexato, si aggiungono 20  $\mu$ L di BHT (butilidrossitoluene) 20 mM disciolto in EtOH, per evitare un'ulteriore ossidazione dei campioni durante il saggio.

Oltre alle preparazioni dei campioni e del controllo, si procede anche alla preparazione di un bianco costituito solo da 600  $\mu$ L di PBS (senza PC), a cui vengono aggiunti, come in tutti gli altri campioni, i 2 mL di reattivo TBA/TCA/HCl e 20  $\mu$ L di BHT 20 mM.

In seguito, tutti i campioni vengono riscaldati a bagnomaria (in un bagno termostato) a 90 °C per 15 minuti perché l'elevata temperatura favorisce la reazione tra i prodotti derivanti dalla perossidazione e l'acido tiobarbiturico.

Si noterà quindi la presenza di un colore rosa, ad indicare che l'avvenuta reazione.

I campioni vengono raffreddati ed in seguito centrifugati a 5000 rpm per 6 minuti.

Una volta recuperato il sovranatante (stando attenti a non perturbare la soluzione) e trasferito in cuvette di lettura, si misura il valore di assorbanza con uno spettrofotometro (Spectrophotometer UVIKON 941 Plus) ad una lunghezza d'onda di 535 nm, contro il bianco costituito da solo reattivo.

Dai valori di assorbanza misurati si dovrebbe ricavare la concentrazione di TBARS tramite una curva di taratura ottenuta facendo reagire concentrazioni crescenti di 1,1,3,3-tetraetossipropano con il TBA. Da questa reazione, infatti, si forma malondialdeide in quantità nota ed i risultati dovrebbero essere espressi in concentrazione di TBARS. Tuttavia, durante questo lavoro di tesi, non è stato possibile reperire il precursore del MDA in commercio, quindi i risultati sono riportati tal quali come valori di assorbanza a 532 nm.

### 6.5.1 Incorporazione degli estratti nei liposomi

I vari estratti della pianta *Cyclopia genistoides*, sono stati testati anche incorporandoli direttamente nei liposomi, quindi in presenza di PC per valutare l'eventuale azione fotoprotettiva, in termini di attività antiossidante, contro il danno ossidativo indotto dai raggi UV nei liposomi.

Per far ciò, dopo aver preparato il film lipidico (paragrafo 6.4.2), viene aggiunto lo stesso volume di tampone fosfato della prova precedente (700  $\mu$ L) ma contenente i vari estratti tale che la concentrazione finale di ogni estratto nel tampone, fosse sempre la stessa delle prove precedenti.

Si procede poi alla formazione dei liposomi vortexando i campioni come descritto nel paragrafo 6.4.1.

Dopo aver allestito, anche in questo caso una multi-well da 24 pozzetti, contenente in ogni pozzetto 700  $\mu$ L di campione, la piastra viene ricoperta con la lastra di quarzo ed esposta ai raggi UVA per 20 minuti come descritto nel paragrafo 6.3.

Dopo irraggiamento, anche in questo caso, la rilevazione del danno ossidativo è stata eseguita mediante il saggio dei TBARS con le stesse modalità descritte nel paragrafo 6.5.

Inoltre, per il saggio TBARS, a differenza di quanto riportato nella sezione 6.4.3 dove gli estratti non erano incorporati nei liposomi, quindi non in contatto con esse, sono stati preparati nello stesso modo dei liposomi contenenti gli estratti, ma senza sottoporli ad irraggiamento; questo è stato necessario perché alcuni degli estratti (ARC2028 e BEF1), hanno una colorazione gialla, che interferiva con la lettura spettrofotometrica a 535 nm.

Quindi dopo il saggio TBARS, l'assorbanza di questi campioni è stata sottratta dall'assorbanza ottenuta dagli stessi campioni esposti ad UVA in modo che la differenza ottenuta fosse indicativa del danno ossidativo.

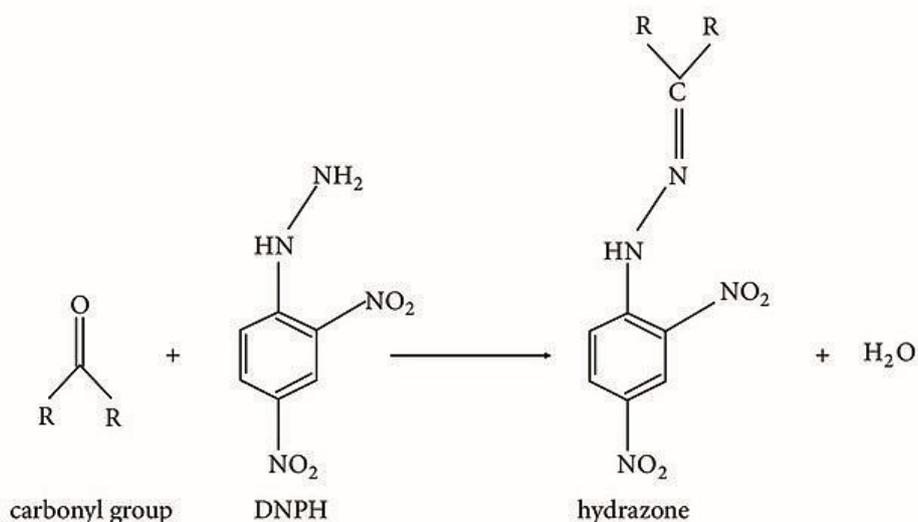
Per ARCP26, la sottrazione del campione non esposto ad UVA, non è stato necessario in quanto è incolore.

## 6.6 Saggio di ossidazione proteica

In questo studio, l'albumina sierica bovina (BSA) è stata scelta come sistema di modello proteico ed è stata sottoposta a irraggiamento UVA in presenza e in assenza degli estratti di Honeybush.

Il danno ossidativo indotto dai raggi UVA a carico della proteina è stato misurato monitorando il contenuto in gruppi di carbonili, un indice di danno a carico di queste macromolecole.

L'analisi dei gruppi carbonili nelle proteine fornisce una tecnica per rilevare e quantificare la modificazione ossidativa delle proteine (Levine, 1990). In questo metodo viene utilizzata la DNPH (2,4-dinitrofenilidrazina) che reagisce con i carbonili per produrre un idrazone (figura 37) che ha un caratteristico assorbimento a 370 nm.



*Figura 37: Reazione che porta alla formazione dell'idrazone durante il saggio dell'ossidazione proteica*

I campioni di proteina sono stati preparati sciogliendo la BSA (Sigma) in una soluzione di PBS 50 mM, pH 7.4, per ottenere una concentrazione pari a 3 mg/mL. 1 mL è stato poi posto nei pozzetti di una piastra multi-well da 24 ed irraggiati come precedentemente descritto nel paragrafo 6.3 a tempi diversi per determinare quale fosse il tempo di esposizione migliore in cui osservare un danno apprezzabile.

Il controllo (non irraggiato) viene tenuto in ghiaccio.

Una volta determinato questo tempo (20 minuti), si è proceduto a testare gli estratti in maniera analoga a quanto riportato per i liposomi.

Anche in questo caso gli estratti vengono testati sia a contatto con la BSA, per valutare la loro eventuale capacità nel ridurre il danno fotossidativo agendo quindi da antiossidanti, che non a contatto con la BSA, per valutare la loro capacità schermante dai raggi UVA, in maniera analoga a quanto riportato per i liposomi.

In questo caso, quando gli estratti sono stati messi in contatto con la BSA, è stato usato un volume di estratto tale che la concentrazione finale in 1 mL di BSA presente in ogni pozzetto, fosse sempre la stessa di quella precedentemente testata per i liposomi.

Sono stati testati in maniera analoga, i filtri commerciali come il BMDBM e il BP-3 come confronto.

Dopo irraggiamento, i campioni sono stati trattati per rilevare il danno ossidativo con il metodo di Levine (Levine, 1990). I reattivi usati consistono in:

- DNPH (Sigma) 20 mM disciolta in HCl 2.5 M
- Soluzione di etanolo/etilacetato 1:1
- Guanidina (Sigma) 6 M pH 6.5
- TCA (Sigma) 20%

Per ogni campione di BSA, è stato prelevato da ogni multi-well 1 mL e suddiviso in maniera equa in due eppendorf, in modo da avere per ognuno di esse il bianco corrispondente da trattare con solo 500  $\mu$ L HCl 2.5 M e l'altra metà da trattare con 500  $\mu$ L DNPH.

Tutti i campioni vengono incubati per 1 ora a temperatura ambiente sotto continua agitazione su un rotore meccanico.

In seguito, la proteina viene precipitata tramite l'aggiunta di 1 mL TCA e centrifugata a 3000 g per 10 minuti.

Il sovrantante viene scartato e al pellet residuo vengono effettuati due lavaggi in 500  $\mu$ L di soluzione di etanolo/etilacetato, a seguito dei quali i campioni sono di nuovo centrifugati a 3000 g. Questo step viene ripetuto due volte ed è necessario per eliminare l'eventuale DNPH che non ha reagito con le proteine. I campioni vengono poi disciolti e vortexati in 1 mL di guanidina.

Infine, il danno ossidativo viene misurato mediante analisi spettrofotometrica a 370 nm leggendo ogni campione contro il bianco corrispondente in apposite cuvette.

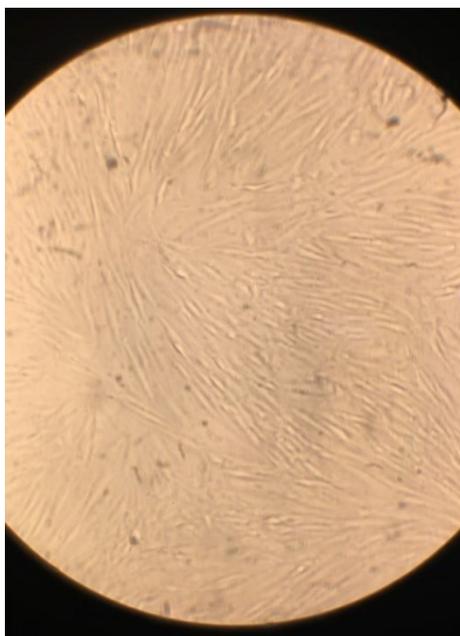
I valori di assorbanza saranno poi convertiti usando il coefficiente di estinzione a 370 nm di  $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , in modo da ottenere il numero di moli di carbonili per 1 mg di proteina.

### **6.7 Valutazione dell'effetto protettivo su colture cellulari**

Dopo aver valutato gli estratti come protezione contro i danni indotti da raggi UVA in macromolecole biologiche, si è voluto testarli anche su un modello cellulare idoneo, per valutare l'eventuale azione fotoprotettiva nei confronti del danno ossidativo intracellulare indotta da raggi UVA.

Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati fibroblasti di derma umano (HUDE: Human Dermal Fibroblasts) coltivate con terreno MEM (Minimal Essential Medium) supplementato con il 10% di FBS (Siero fetale bovino), 1% penicillina/streptomina e 1% glutammina.

Le HUDE sono cellule che crescono in monostrato caratterizzate dalla tipica forma fusiforme (figura 38), che si ottiene una volta raggiunta la confluenza intorno al 100%.



*Figura 38: Aspetto caratteristico di fibroblasti del derma umano visualizzati al microscopio*

Nell'allestimento della coltura cellulare, è fondamentale mantenere la massima sterilità, utilizzando non solo supporti sterili, ma anche prendendo tutti i possibili accorgimenti utili ad evitare qualsiasi tipo di contaminazione, poiché materiali come i mezzi di coltura rappresentano l'habitat ideale per lo sviluppo e la crescita di batteri, lieviti e funghi. A tal proposito tutti i dispositivi utilizzati sotto cappa a flusso laminare per il trattamento delle colture cellulari sono stati sterilizzati mediante l'utilizzo dell'alcool 70%.

Le cellule sono state fatte crescere a 37°C in un incubatore con atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>.

Ai fibroblasti, durante la fase di crescita, veniva cambiato il terreno di coltura ogni due o tre giorni, dopo averlo preriscaldato in un bagnetto termostato a 37°C per evitare qualsiasi tipo di shock termico.

Una volta raggiunta una confluenza intorno all'80%, le cellule vengono staccate dalla piastra utilizzando la tripsina, un enzima proteolitico che digerisce il materiale glico-proteico presente sulla membrana cellulare responsabile dell'adesione.

In seguito le cellule vengono contaminate attraverso l'utilizzo della camera di Burker. 20,000 cellule vengono poi seminate in un volume di 500 µL di MEM in pozzetti per le piastre multi-well da 24. Dopo la semina, le cellule vengono fatte crescere per diversi giorni, fino al raggiungimento di una confluenza pari al 75%.

Gli esperimenti sono stati effettuati tra il 9° e il 20° passaggio cellulare.

### **6.7.1 Saggio del MitoSox RED tramite citofluorimetria a flusso**

La citofluorimetria a flusso è una tecnica che permette di contare e discriminare le cellule a seconda della loro struttura e morfologia. Le cellule o elementi corpuscolati vengono aspirati mediante un capillare che permette di ricreare un flusso laminare, durante il quale vengono eccitate da uno o più laser. Una volta eccitate, il segnale emesso è catturato da foto rilevatori che ne permettono, tramite determinati software, la traduzione in segnale digitale e quindi in un dato numerico. Lo strumento utilizzato è stato un citofluorimetro a flusso Guava Easycyte 5HT (Merck Millipore), fornito di due raggi laser eccitanti uno nel blu (488nm) e uno nel rosso (642 nm). Vengono fornite informazioni riguardanti la dimensione e la complessità

cellulare, determinando quindi la distribuzione delle cellule in relazione alla morfologia cellulare. Per l'analisi si utilizza il software Easycyte Guava (Millipore).

Il rilevamento e la misurazione dei ROS nei compartimenti intracellulari sono determinante per comprendere le attività biologiche di ROS specifici. In questo contesto, i mitocondri sono stati identificati come una delle principali fonti di ROS a livello cellulare ed in particolare di superossido radicale.

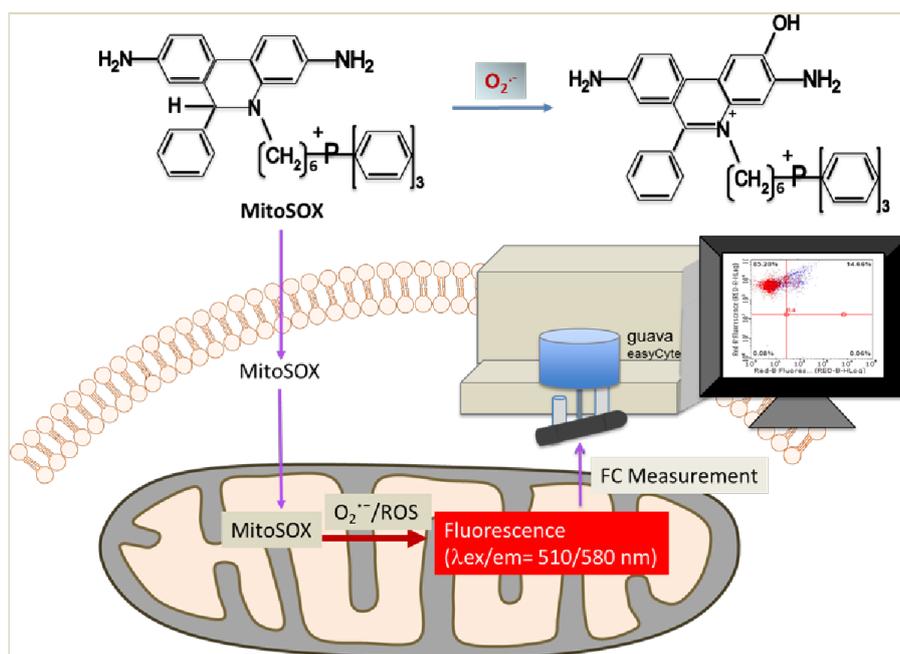
I saggi basati sulla sonda fluorimetrica MitoSOX sono ampiamente utilizzati per rilevare i ROS mitocondriali, in particolare il superossido radicale.

Il reagente MitoSOX Red (ThermoFisher) è un nuovo colorante fluorogenico specificamente mirato ai mitocondri nelle cellule vive (Kauffman, 2016).

La presenza di un gruppo di trifenilfosfonio conferisce a questa molecola proprietà nernstiana che ne determinano un accumulo nelle membrane cariche e quindi massima nei mitocondri. La sonda viene fornita nello stato ridotto e come tale non fluorescente, la fluorescenza determinata in seguito all'ossidazione le conferiscono la proprietà di rilevare quantitativamente le specie reattive dell'ossigeno ed in particolare a livello mitocondriale l'anione superossido.

L'intensità della fluorescenza può essere associata a diverse tecniche quali la fluorimetria, la microscopia o la citofluorimetria a flusso.

Una volta nei mitocondri, questa sonda viene ossidata dal superossido radicale emettendo una fluorescenza rossa e viene stabilizzata intercalandosi al DNA mitocondriale (figura 39).



*Figura 39: Meccanismo di azione della sonda MitoSOX RED*

La sonda è però sensibile alla luce ed è soggetta ad autossidazione, evento che può compromettere l'accuratezza del rilevamento del superossido radicale mediante citofluorimetria a flusso. Per tale motivo, gli esperimenti vanno eseguiti al buio (Zielonka, 2008).

Una volta che le cellule sono arrivate a giusta confluenza, prima dell'esposizione agli UVA viene rimosso il terreno MEM e le cellule vengono lavate una volta con PBS (500  $\mu\text{L}$ ) e poi coperte con un sottile strato di PBS (500  $\mu\text{L}$ ).

Al di sopra della piastra multiwell, in corrispondenza di ciascun pozzetto, sono stati posti dei becker con fondo di quarzo contenenti gli estratti da testare (ARCOP26 ad una concentrazione finale 100  $\mu\text{M}$  e ARC2028 e BEF1 ad una concentrazione finale di 0.1 mg/mL) e la piastra multiwell è stata esposta a 15 min UVA (un tempo di esposizione sub-letale precedentemente scelto in base al saggio di vitalità effettuato su HUDE con il PrestoBlue), con la stessa procedura descritta nelle sezioni precedenti. Dopo esposizione agli UVA, il PBS viene rimosso. Contemporaneamente la sonda MitoSOX viene ricostituita in DMSO (dimetilsolfossido), assumendo un colore rosa e viene diluita 1:1000 con terreno

MEM all'1% di FBS (concentrazione finale 5 $\mu$ M). In ogni pozzetto si aggiungono 150  $\mu$ L di terreno contenente la sonda e la piastra viene incubata per 10 minuti a 37°C al buio.

Trascorso questo tempo, le cellule vengono lavate una volta con 200  $\mu$ L PBS, staccate mediante trattamento con 100  $\mu$ L tripsina per 5 minuti, la quale viene poi neutralizzata tramite l'aggiunta di 200  $\mu$ L MEM.

I campioni vengono poi trasferiti in eppendorf e sottoposti a centrifugazione per 5 minuti a 500 *g*, al termine del quale si elimina il surnatante e le cellule vengono risospese in 200  $\mu$ L PBS.

La sospensione cellulare viene infine letta in citofluorimetria (Guava Easycite, Merck Millipore) consentendo la misurazione in tempo reale dell'emissione di fluorescenza di ogni campione.

I parametri di acquisizione relativi alla sensibilità dei fotomoltiplicatori per ciascun canale erano: FSC (Forward scatter) 19.9; SSC (Side scatter) 5.66; G (Green fluorescence) 1; Y (Yellow fluorescence) 2.48; R (Red fluorescence) 8.72.

L'uso del software Easycite permette di calcolare dei gate o regioni di interesse nei quali ricadono le cellule con alto (HIGH) o basso (LOW) contenuto di ROS mitocondriali definite arbitrariamente analizzando fluorescenza del Mitosox in un controllo negativo costituito da fibroblasti di derma umano non irradiati nei quali la percentuale delle cellule che ricadevano nella regione HIGH è stato arbitrariamente definito intorno al 10-15%.

## CAPITOLO 7

### RISULTATI

#### 7.1 Analisi degli spettri di assorbanza

Come prima analisi, sono stati esaminati gli spettri UV dei composti utilizzati per verificare i rispettivi profili di assorbanza.

Sono stati provati vari solventi in cui disciogliere gli estratti, per vedere come variavano gli spettri in funzione di questi.

Gli estratti sono stati usati a concentrazioni finali di 100  $\mu\text{M}$  (ARCOP26) e 0.1 mg/mL (ARC2028 e BEF-1).

Inizialmente è stato testato come solvente l'acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), che è stato usato per disciogliere ARCOP26 e come confronto è stato utilizzato il BP-3, benzofenone sintetico commercialmente usato nelle varie composizioni delle creme solari. Gli spettri relativi sono mostrati in figura 40.

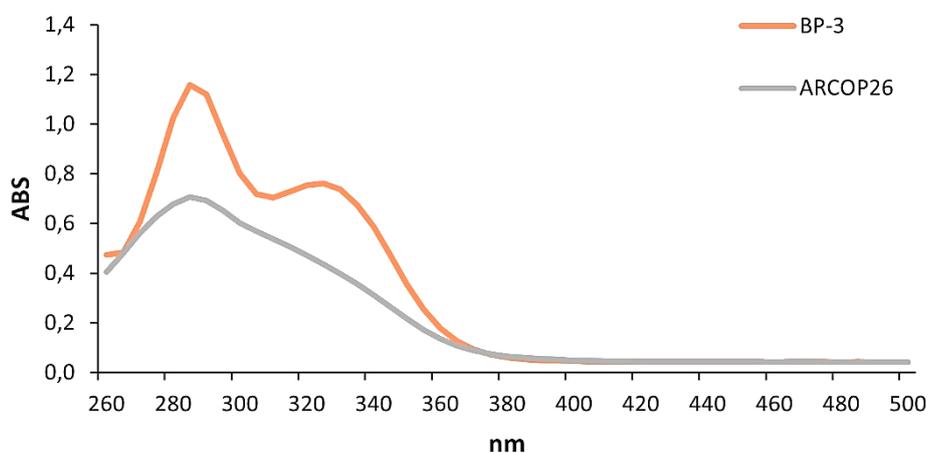


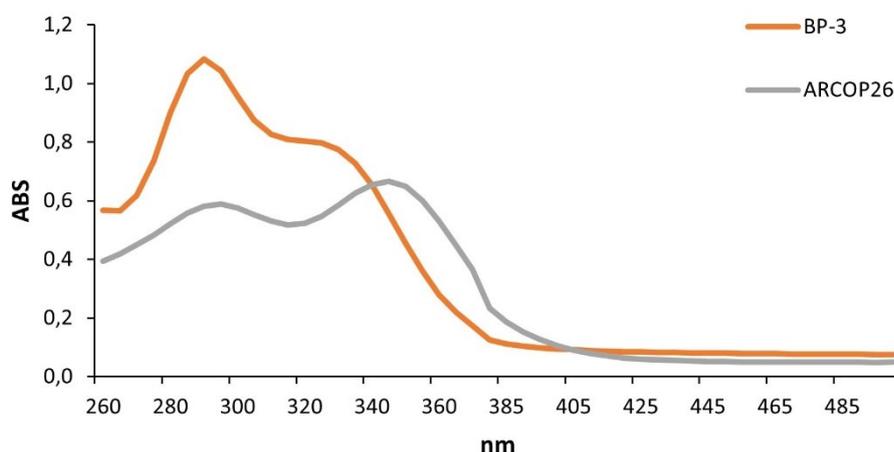
Figura 40: Confronto spettri di assorbanza di ARCOP26 e BP-3 in  $\text{CH}_3\text{CN}$

Osservando il grafico, si nota che ARCOP26 ha uno spettro di assorbimento che va dai 260 ai circa 360 nm, ricoprendo tutta la zona degli UVB e in parte quella degli UVA con un decremento dai 300 nm in poi.

Come si nota dal confronto, gli spettri sono diversi in quanto il BP-3 ha un'assorbanza superiore a parità di concentrazione per entrambi i picchi rilevati rispetto al derivato benzofenonico isolato dall'Honeybush preso in esame.

Sicuramente uno dei motivi responsabili per le differenze notate risiede nel fatto che ARCOP26 non si discioglieva completamente in CH<sub>3</sub>CN e quindi non era perfettamente solubile.

Si è passati quindi ad analizzare i rispettivi spettri in PBS, riportati in figura 41.



*Figura 41: Confronto spettri di assorbanza ARCOP26 e BP-3 in PBS*

Dalla figura si può osservare come l'ARCOP26 in presenza di PBS cambi completamente lo spettro a differenza del BP-3 che rimane sostanzialmente uguale a quello ottenuto in CH<sub>3</sub>CN.

ARCOP26 mostra un aumento di assorbanza notevole nella zona degli UVA (320-400 nm) arrivando a coprire quasi interamente la regione, pur mantenendo l'assorbanza nella zona degli UVB, anche se con valori inferiori rispetto al BP-3.

Questo indica che la differenza di solvente tra organico e inorganico in cui si sceglie di solubilizzare il filtro in esame, incide sul suo spettro di assorbimento che subisce una trasformazione.

È stata poi fatta un'ulteriore prova usando come solvente l'etanolo con cui è stato disciolto ARCOP26 (figura 42).

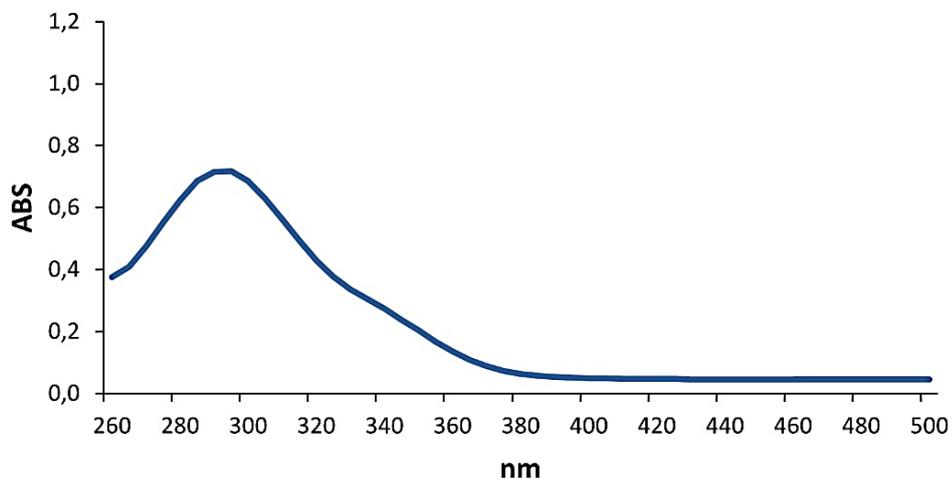


Figura 42: Spettro di assorbimento di ARCOP26 in EtOH

Osservando l'assorbanza non si notano sostanziali differenze rispetto a quello ottenuto in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , nonostante fosse più solubile in questo solvente senza la presenza visiva di alcun tipo di precipitato.

Considerando i risultati ottenuti, tenendo conto del cambiamento spettrale che questo composto subisce, passando da un solvente polare (acqua) ad uno meno polare (etanolo), si è deciso di andare a testare soluzioni con diverse percentuali di EtOH in PBS (figura 43).

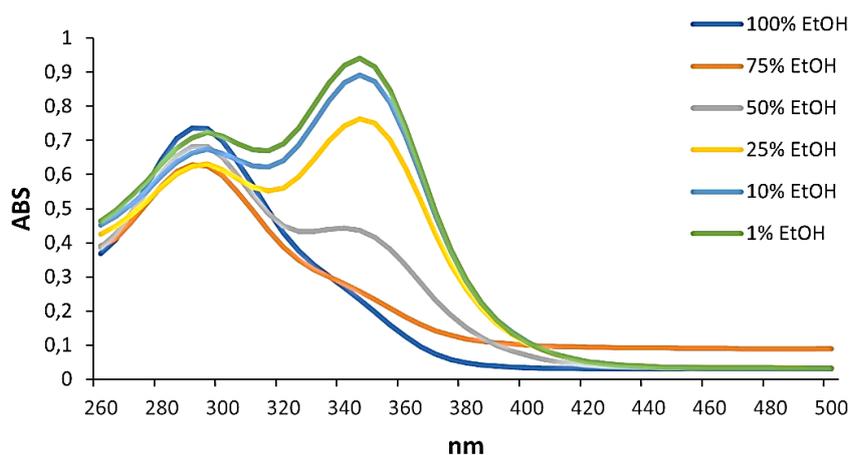


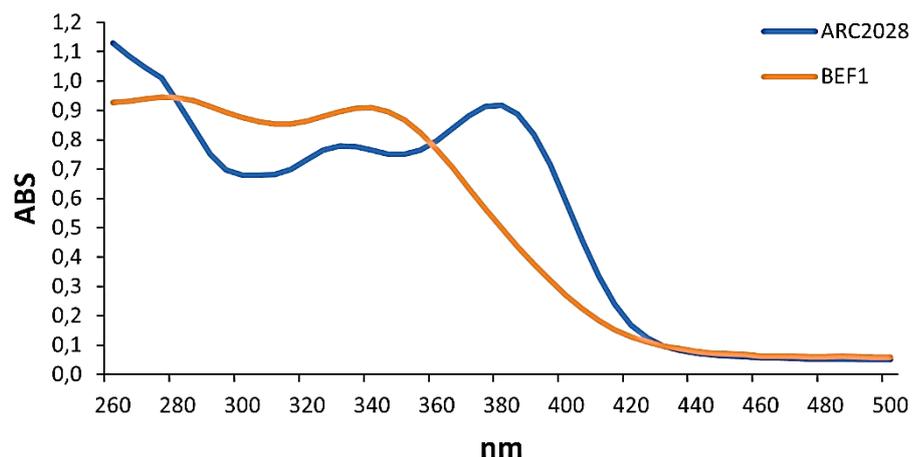
Figura 43: Spettri di assorbimento di ARCOP26 con diverse percentuali di EtOH

Dalla figura si evince il concetto precedentemente espresso; in base alla percentuale di etanolo aggiunto, e quindi con una diminuzione della polarità, a parità di concentrazione del filtro, si ha una variazione dello spettro di assorbimento.

Con una percentuale di EtOH del 100 e del 75, il profilo non cambia; lo shift si inizia a vedere con una percentuale del 50, fino a cambiare completamente dal 25% in poi.

Valori di assorbanza maggiori vengono evidenziati quando la percentuale di EtOH è dell'1%, ragione per la quale, si è deciso di procedere alle analisi successive usando questa composizione.

Dopo aver scelto come solubilizzare ARCOP26, tale che il suo spettro di assorbimento mostra le caratteristiche tipiche e desiderabili di un filtro UV ad ampio spettro (ovvero che assorbe sia nella zona degli UVA che in quella degli UVB), si è proseguito andando ad analizzare gli altri due estratti, ARC2028 e BEF1 in EtOH all'1% (figura 44).



*Figura 44: Spettri di assorbimento ARC2028 e BEF1 in una soluzione all'1% EtOH/PBS*

I due estratti hanno uno spettro di assorbimento simile, coprendo entrambi le regioni degli UVB e UVA, con un marcato spostamento verso lunghezze d'onda maggiori nel caso di ARC2028 con un alto picco di assorbimento a 385 nm. Nonostante BEF1 abbia uno spettro di assorbanza leggermente più alto rispetto ad ARC2028, dai 360 nm in poi si assiste ad un progressivo calo di assorbanza.

Questi risultati mostrano che entrambi gli estratti hanno le caratteristiche tipiche dei filtri UV commerciali ad ampio spettro che assorbono in entrambi le regioni UVA/UVB.

La concentrazione degli estratti è stata scelta in modo da ottenere un valore di assorbanza massimo per tutti e tre gli estratti intorno ad 1, per fare in modo che fossero equiparabili tra loro, come viene mostrato nella figura successiva (*Figura 45*), concentrazioni che sono state poi usate per tutte le analisi successive in questo lavoro di tesi.

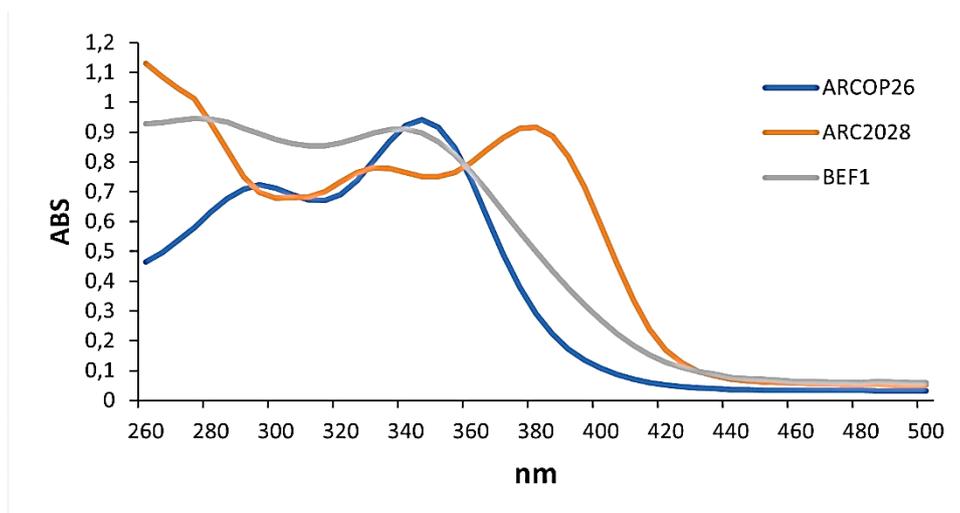


Figura 45: Confronto degli spettri di assorbimento dei tre estratti disciolti in una soluzione all'1% EtOH; BEF1 e ARC2028(1 mg/mL), ARCOP26 (100  $\mu$ M)

## 7.2 Analisi fotostabilità degli estratti

Dopo aver deciso il solvente più appropriato, per determinare la fotostabilità dei composti è stata allestita una multi-well da 96 dove sono stati sottoposti ad irraggiamento UVA a tempi diversi: 0,5,15,20 minuti. Il Tempo 0 corrisponde all'estratto non irraggiato. Gli spettri risultanti sono riportati nelle figure 46- 48 e sono la media di almeno tre esperimenti.

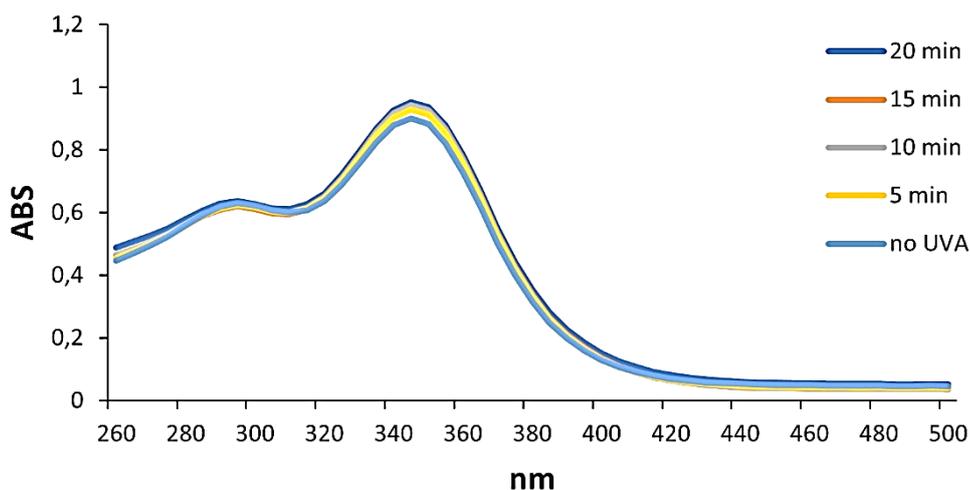


Figura 46: Spettro di assorbimento di ARCOP26 prima e dopo vari tempi di irraggiamento UVA (5',10',15' e 20')

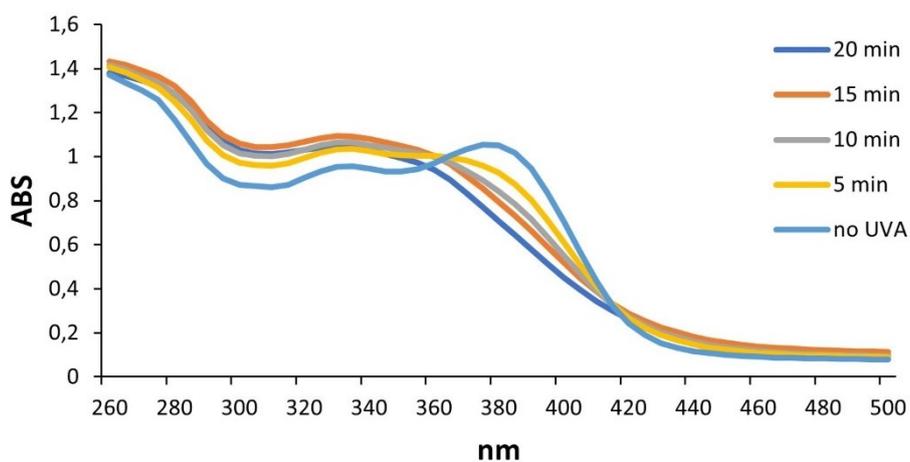


Figura 47: Spettro di assorbimento di ARC2028 prima e dopo vari tempi di irraggiamento UVA (5', 10', 15' e 20')

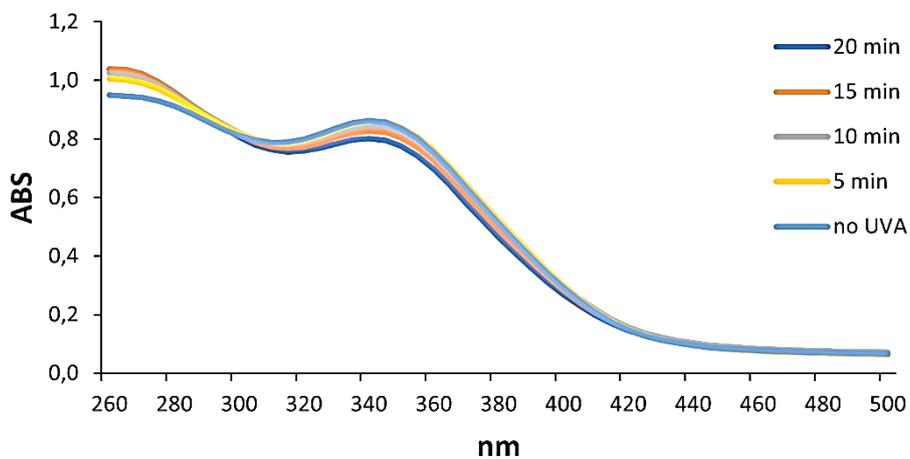


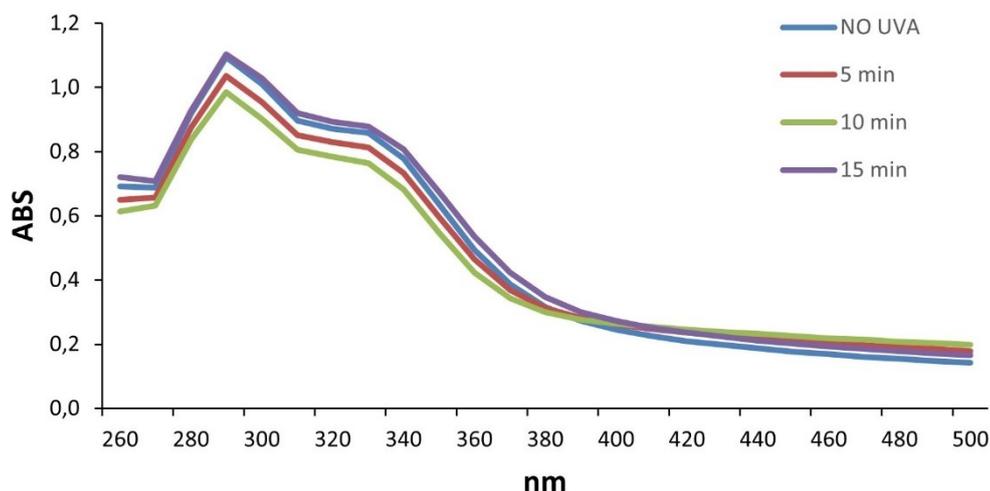
Figura 48: Spettro di assorbimento di BEF1 prima e dopo vari tempi di irraggiamento UVA (5', 10', 15' e 20')

Osservando i vari spettri, si nota che gli estratti analizzati sono tutti fotostabili ai vari tempi di esposizione fino ai 20 minuti, in quanto sono praticamente tutti uguali. L'unica differenza che merita di nota è nell'estratto ARC2028 a livello del picco a 385 nm, dove questo picco decade di circa il 30% dopo 20 minuti di esposizione. Tuttavia, a lunghezze d'onda inferiori, lo spettro mostra notevole stabilità, con addirittura un leggero aumento di assorbanza con l'aumentare dell'esposizione.

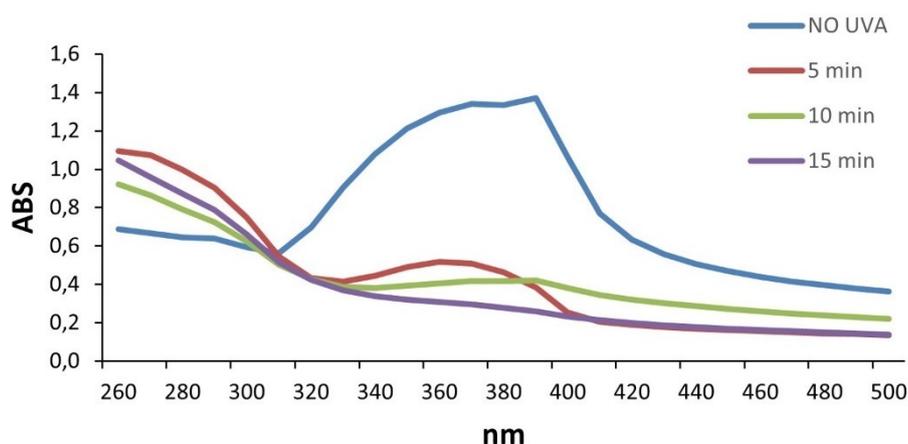
Per vedere un confronto con i filtri commerciali, sono stati analizzati gli spettri prima e dopo irraggiamento a tempi diversi anche per BP-3 e BMDBM, quest'ultimo noto per essere un filtro fotoinstabile.

Entrambi i filtri sono stati analizzati ad una concentrazione di 100  $\mu\text{M}$  nella stessa miscela di solvente usata per gli estratti (1% EtOH/PBS).

Come si vede dalla figura 49, il BP-3 risulta essere fotostabile anche dopo 15 minuti di esposizione ai raggi UVA, il BMDBM, invece, come mostrato in figura 50, già dopo 5 minuti di irraggiamento mostra dei cambiamenti nel profilo spettrale, indicando la sua fotoinstabilità.



*Figura 49: Spettro di assorbimento di BP-3 prima e dopo vari tempi di irraggiamento UVA (5', 10' e 15')*



*Figura 50: Spettro di assorbimento di BMDBM prima e dopo vari tempi di irraggiamento UVA (5',10' e 15')*

### **7.3 Effetto protettivo su macromolecole biologiche: I Lipidi**

In seguito all'indagine sulla fotostabilità dei filtri in esame mediante analisi degli spettri di assorbanza prima e dopo l'esposizione agli UVA, si è andati a verificare se questi composti riuscissero a proteggere dal danno fotoindotto su macromolecole biologiche quali lipidi (sottoforma di liposomi) e proteine (BSA) dopo esposizione ai raggi UVA.

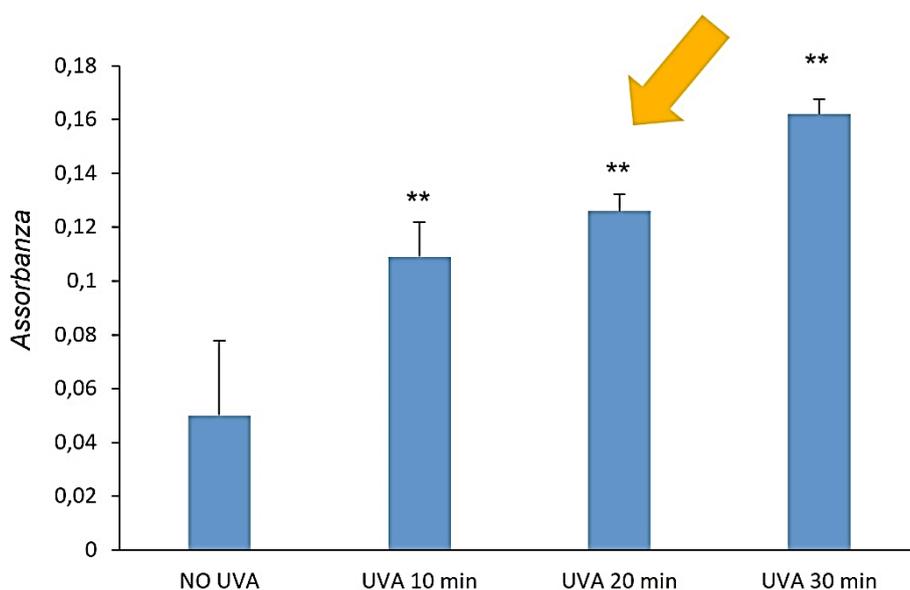
Come già riportato precedentemente è stato usato come sistema modello, liposomi di fosfatidilcolina, in quanto suscettibili alla perossidazione lipidica indotta da parte dei ROS dopo esposizione ai raggi UVA, e facilmente valutabile mediante il saggio TBARS.

L'eventuale fotoprotezione è stata valutata sia quando gli estratti erano incorporati nei liposomi (effetto antiossidante), sia quando non lo erano (effetto schermante) per vedere se riuscissero ad esplicare una funzione protettiva in entrambi i casi.

In primis, si è dovuto scegliere il tempo di esposizione in cui si poteva osservare un effetto apprezzabile del fotodanno sui liposomi. Per far ciò i liposomi sono stati irraggiati a tempi diversi (0, 10', 20' e 30') (figura 51).

Dai risultati si nota un aumento significativo della perossidazione lipidica con l'aumento del tempo di esposizione.

In base a ciò, si è deciso di proseguire con un irraggiamento di 20 minuti, un tempo che risulta sufficiente per indurre un danno apprezzabile.



*Figura 51: Valutazione della perossidazione lipidica tramite il saggio TBARS (assorbanza a 532 nm), in liposomi di PC esposti a diversi tempi di irraggiamento UVA. La freccia sta ad indicare il tempo di esposizione scelto per le analisi successive. \*\* =  $p < 0,01$ . I dati sono riportati come media  $\pm$  D.S.,  $n=3$ .*

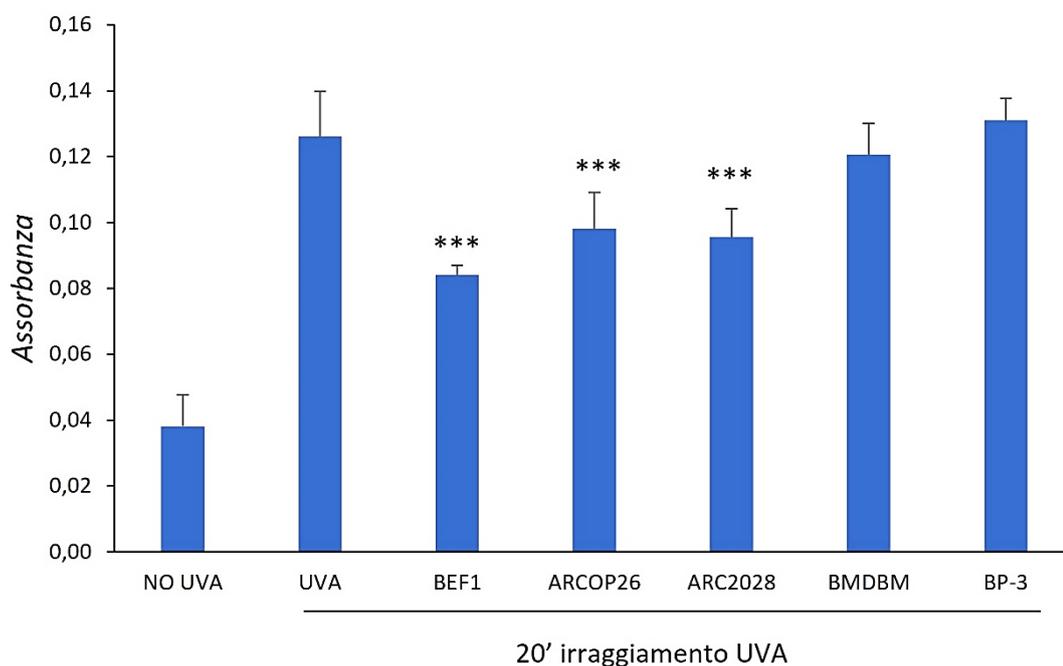
La figura 52 mostra i risultati ottenuti dopo esposizione a 20 minuti di UVA in presenza degli estratti /filtri non incorporati nei liposomi.

Questa situazione è più realistica di quella in cui gli estratti/filtri vengono incorporati nei liposomi perché nella realtà i filtri UV, presenti nelle creme solari, non dovrebbero mai attraversare la barriera lipidica della pelle (essere assorbiti dalla pelle) ed entrare nel circolo sistemico, ma dovrebbero rimanere sopra la pelle, ovvero dovrebbero agire da schermanti dei raggi UV.

Come si vede vi è una netta differenza (di circa 3 volte) nei valori di assorbanza tra il controllo negativo e il controllo positivo, indice del fatto che nel secondo vi è un'aumentata produzione di ROS in seguito all'esposizione ai raggi UVA.

Confrontando i filtri, BEF1, ARCOP26 e ARC2028, si nota che tutti e tre causano una significativa diminuzione dei livelli di assorbanza e quindi di perossidazione lipidica ( $p < 0.001$ ). Questo risultato è indice del fatto che i vari estratti, con i rispettivi spettri di assorbimento (descritti nel paragrafo 7.1) riescono a schermare i raggi UVA e quindi a proteggere dal danno ossidativo.

Per confronto, sono stati testati anche il BMDBM e il BP-3; in questo caso si nota che i filtri non mostrano una significativa protezione ( $p > 0.05$ ), risultato riconducibile all'analisi degli spettri descritti in precedenza, dove il BMDBM si degrada dopo irradiazione UVA quindi viene a mancare il suo effetto schermante, mentre per il BP-3, esso ricopre solo parzialmente la zona degli UVA rispetto agli estratti di Honeybush.



*Figura 52: Confronto della perossidazione lipidica tramite il saggio TBARS (assorbanza a 532 nm), in liposomi di PC esposti a 20 min UVA, in presenza ed in assenza di estratti/filtri posti sopra i liposomi di PC*

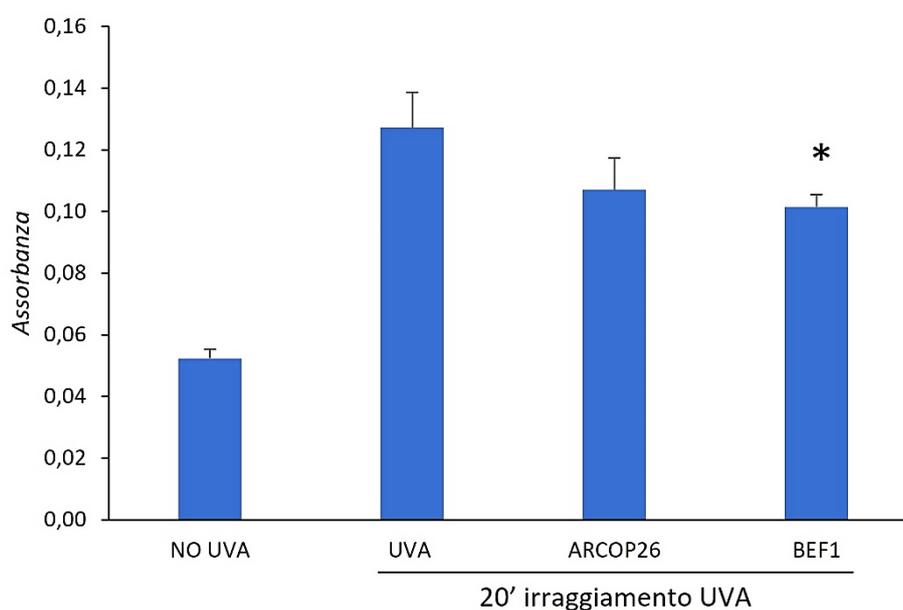
\*\*\* =  $p < 0.001$ . I dati sono riportati come media  $\pm$  D.S.  $n=3$

La figura 53 mostra i risultati ottenuti dopo esposizione a 20 minuti UVA in presenza degli estratti incorporati in liposomi di PC. Si è voluto testare anche questa possibilità di azione, in quanto questi estratti anziché essere applicati eventualmente a livello topico, potrebbero essere assunti come bevande e quindi raggiungere per via sistemica il derma che viene colpito dai raggi UVA.

In questo caso sono stati presi in esame solo ARCOP26 e BEF1 (quest'ultimo presenta uno spettro di assorbimento circa uguale ad ARC2028 ed è un estratto più ricco in benzofenoni).

I risultati mostrano che solo in presenza di BEF1 si osserva una diminuzione significativa in perossidazione lipidica rispetto ad ARCOP26 ( $p < 0.05$ ).

Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che ARCOP26 è un unico composto benzofenonico, il quale alla concentrazione testata, dimostra avere una scarsa capacità antiossidante nel sistema studiato. Al contrario, BEF1 è costituito da una miscela di benzofenoni ed altri composti fitochimici che nel loro insieme potrebbero essere in grado di esercitare un maggiore effetto antiossidante.



*Figura 53: Confronto della perossidazione lipidica tramite il saggio TBARS (assorbanza a 532 nm), in presenza ed in assenza di estratti incorporati in liposomi di PC ed esposti a 20 min UVA.*

*\* =  $p < 0.05$ . I dati sono riportati come media ± D.S. n=3*

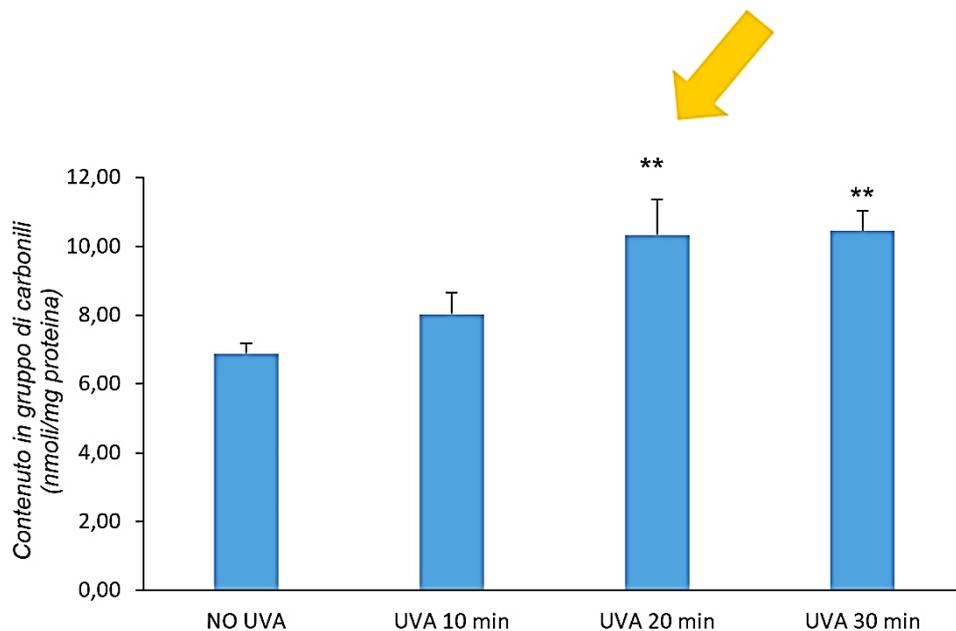
#### **7.4 Effetto protettivo su macromolecole biologiche: Le Proteine**

Successivamente è stata indagata l'eventuale fotoprotezione dei vari estratti/filtri nei confronti di una proteina modello come la BSA, facendo un confronto tra il danno fotossidativo indotto da raggi UVA in presenza degli estratti/filtri e in loro assenza, in maniera analoga a quanto riportato per i liposomi.

In primis, si è dovuto prima esporre la BSA a tempi crescenti di UVA per scegliere un tempo di esposizione in cui le differenze tra l'irraggiato e non irraggiato fosse significativamente apprezzabile. I risultati sono mostrati in figura 54.

Dal grafico si nota che dopo 10 min di irraggiamento, non si hanno notevoli differenze rispetto al non irraggiato ( $p > 0.05$ ), mentre dopo irraggiamento 20 min di irraggiamento UVA, si osserva un incremento apprezzabile nel contenuto in gruppi carbonili, motivo per il quale è stato scelto questo tempo nelle prove successive.

L'esposizione agli UVA per 30 min è stata esclusa in quanto nonostante aumentasse il tempo, l'incremento in numero di gruppi carbonili non era notevolmente differente rispetto ai 20', indice del fatto che il danno fotossidativo non era più rapportabile al tempo di esposizione.



*Figura 54: Contenuto in gruppi carbonili, indice di ossidazione proteica, nella BSA dopo esposizione a tempi diversi di UVA.*

*La freccia sta ad indicare il tempo scelto.*

*\*\* =  $p < 0.01$ . I dati sono riportati come media  $\pm$  D.S.  $n=3$*

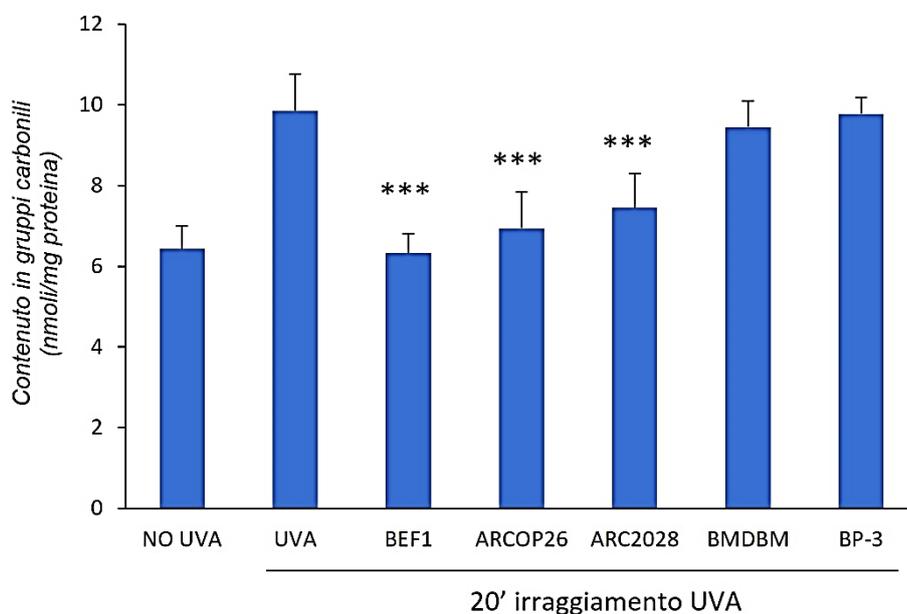
Successivamente, l'eventuale effetto fotoprotettivo è stato valutato nella BSA irraggiata per 20 minuti in presenza dei diversi estratti/filtri.

Anche in questo caso, in maniera analoga ai liposomi, sono stati testati gli estratti/filtri in contatto con la BSA e incorporati nella BSA.

La *figura 55* mostra i risultati ottenuti quando gli estratti/filtri erano posti all'interno dei becker con fondo di quarzo e posti sopra la BSA per valutare il loro eventuale potere schermante dai raggi UVA.

Osservando le differenze nel contenuto in gruppi carbonili tra i 3 estratti presi in esame, si nota che in tutti e tre i casi il contenuto in gruppi carbonili si abbassa significativamente ( $p < 0.001$ ), raggiungendo quasi il valore del controllo negativo. Ciò indica che hanno schermato in maniera adeguata i raggi UVA impedendo il loro raggiungimento alla proteina sottostante. In tal modo hanno quindi limitato il grado di fotossidazione che si riflette nel minore contenuto in gruppi carbonili.

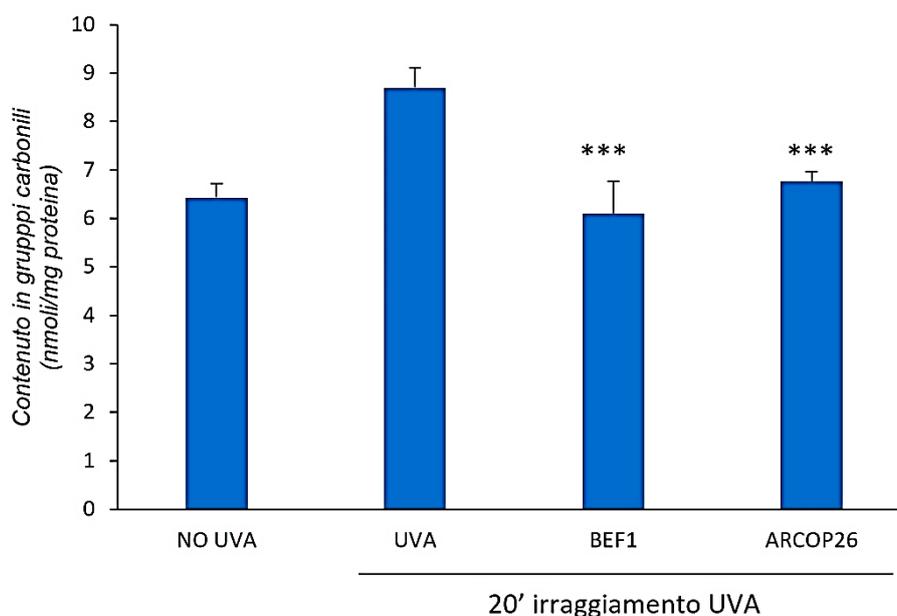
Come confronto sono stati testati BMDBM e BP-3 dove mostrano di non avere un effetto protettivo, riconducibile molto probabilmente alle stesse motivazioni commentate in precedenza per i liposomi.



*Figura 55: Contenuto in gruppi carbonili, indice di ossidazione proteica, nella BSA dopo esposizione a tempi diversi di UVA in presenza ed in assenza di estratti/filtri posti sopra la proteina.*

\*\*\* =  $p < 0.001$ . I dati sono riportati come media  $\pm$  D.S.  $n=3$

Successivamente sono stati testati i due estratti ARCOP26 e BEF1 incorporati nella BSA prima dell'esposizione ai raggi UVA. I risultati sono riportati nella *figura 56*. A differenza di quanto osservato nei liposomi in PC, ARCOP26 e BEF1 hanno entrambi esercitato un significativo effetto fotoprotettivo contro l'ossidazione della BSA. Questo diverso risultato sembra indicare che gli estratti siano più efficaci nell'interrompere il processo perossidativo in proteine rispetto ai lipidi. Ciò potrebbe essere riconducibile alla natura più idrofila della BSA, simile a quella degli estratti, e quindi una maggiore probabilità di intercettazione ed interazione tra gli estratti e le specie reattive ossidanti innescate nella BSA in seguito ad esposizione UVA.



*Figura 56: Confronto tra il contenuto in gruppi carbonili, indice di ossidazione proteica, in presenza ed in assenza di estratti incorporati nella BSA ed esposti a 20 min UVA.*

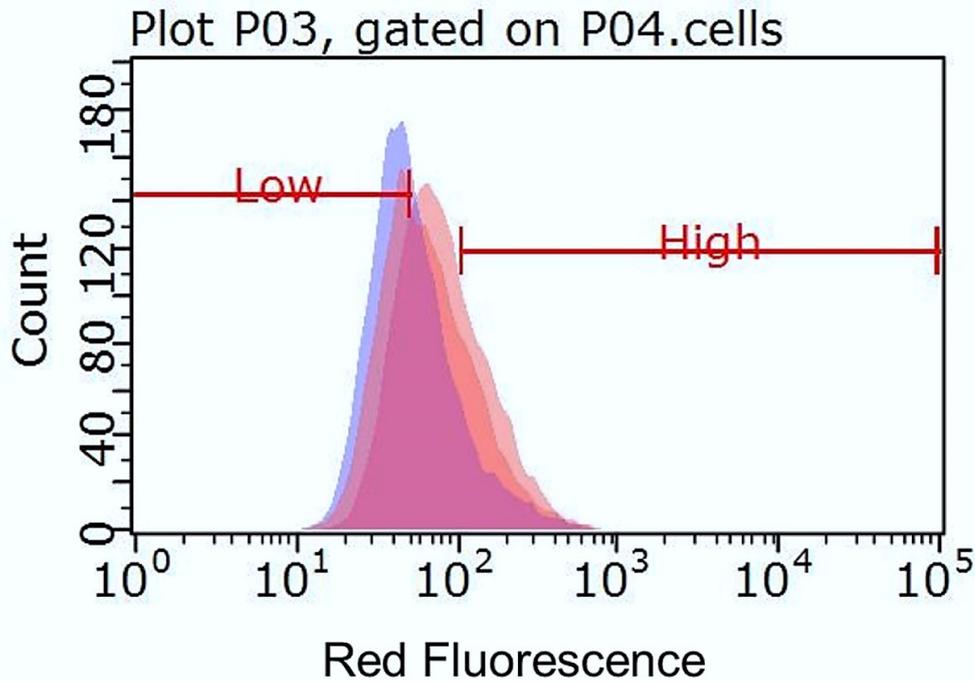
\*\*\* =  $p < 0.001$ . I dati sono riportati come media  $\pm$  D.S.  $n=3$

### **7.5 Effetto fotoprotettivo a livello mitocondriale in fibroblasti di derma umano**

La sonda fluorescente MitoSOX RED è stata utilizzata per rilevare i ROS mitocondriali, soprattutto il radicale superossido, in fibroblasti esposti ad UVA, e per verificare se la produzione di ROS mitocondriale potesse essere minimizzata dal possibile effetto schermante degli estratti.

Nella figura 57, vengono confrontate le distribuzioni di cellule in relazione alla fluorescenza del MitoSOX proporzionale al contenuto di ROS mitocondriali.

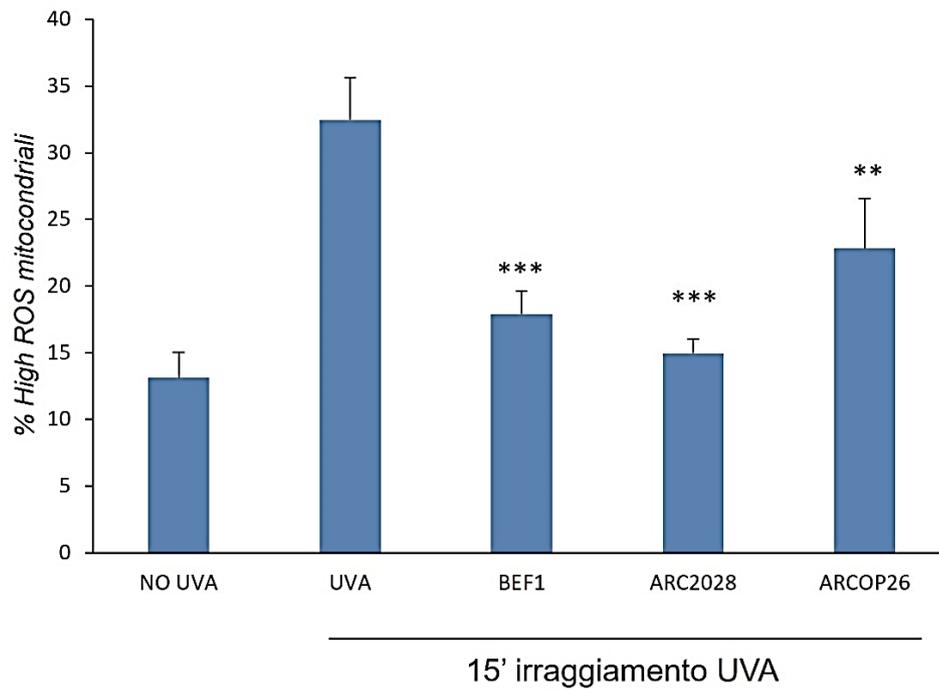
Nello specifico la figura riporta il controllo negativo, non irraggiato (in blu) e il controllo positivo, irraggiato (in rosso). Le distribuzioni risultano significativamente diverse anche tenendo conto del fatto che le intensità di fluorescenza sono espresse in scala logaritmica.



*Figura 57: Confronto in emissione di fluorescenza tra il controllo non irraggiato (in blu) e il controllo irraggiato per 15' (in rosso)*

L'analisi quantitativa relativa ai tre esperimenti distinti (triplicato biologico) è riportata in figura 58, dove ciascun istogramma riporta la media e la deviazione standard delle cellule che ricadevano nel gate HIGH ad alto contenuto di ROS mitocondriali nelle cellule irraggiate, non schermate o schermate dagli estratti, e in cellule di controllo non irraggiate.

I dati mostrano come l'esposizione ai raggi UVA induca una notevole produzione di ROS mitocondriali, come dimostrato dall'innalzamento dei livelli di high ROS, i quali in presenza degli estratti diminuiscono notevolmente, ritornando quasi ai livelli del controllo non irraggiato. Questo dimostra che gli estratti di Honeybush sono stati in grado di schermare i raggi UVA, prevenendo l'esposizione dei fibroblasti sottostanti e la conseguente produzione di ROS mitocondriali.



*Figura 58: Livelli di High ROS mitocondriali rilevati mediante il saggio con MitoSox Red in fibroblasti di derma umano esposti a 15 min UVA ed in presenza di diversi estratti usati come agenti schermanti.*

*\*\*\*=  $p < 0.001$  e \*\*=  $p < 0.01$*

*I dati sono riportati come media  $\pm$  D.S. n=3*

## CAPITOLO 8

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Negli ultimi decenni, l'assottigliamento dello strato di ozono dovuto all'aumento dell'inquinamento atmosferico ha aggravato gli effetti negativi dell'eccessiva esposizione ai raggi ultravioletti solari (UVR) e il cancro della pelle è diventato una delle principali preoccupazioni per la salute pubblica.

Dato che i raggi UV sono il principale fattore di rischio ambientale per lo sviluppo di tumori della pelle, sono presenti strategie per ridurre al minimo l'esposizione ai raggi UV che ad esempio includono modifiche dello stile di vita, indumenti protettivi contro i raggi UV e prodotti per la protezione solare applicati localmente, come le creme solari.

Le formulazioni topiche di protezione solare disponibili in commercio utilizzano agenti attivi che rientrano in due classi principali: molecole organiche che assorbono principalmente l'energia UVR e molecole inorganiche (o fisiche a base minerale) che riflettono ulteriormente i raggi UVR.

Tuttavia, l'efficacia e la sicurezza di alcuni filtri UV, componenti dei protettivi solari, sono ostacolate dalla loro fotoinstabilità, tossicità e danni provocati sia alla salute umana che agli ecosistemi marini.

Per questi motivi, alcuni gruppi hanno lavorato allo sviluppo di composti per la protezione solare che aderiscono allo strato corneo e hanno una penetrazione minima attraverso lo strato corneo (Warthan, 2005). Approcci di successo recenti includono l'incapsulamento di filtri organici per la protezione solare in silice mesoporosa e l'incapsulamento di filtri solari organici in nanoparticelle bioadesive con superfici ricche di aldeide che si legano in modo covalente alle proteine libere sullo strato corneo (Deng, 2015).

I consumatori però stanno diventando sempre più attenti riguardo la provenienza dei prodotti che utilizzano, se di origine sintetica o naturale, e se sono ecologici ed ecosostenibili e nonostante ci sia la consapevolezza che i filtri solari siano uno strumento innegabilmente importante nella lotta contro il cancro della pelle, potrebbe essere necessario migliorarne le formulazioni per contenere ingredienti

più sicuri e resistenti all'acqua, in particolare alla luce delle preoccupazioni sollevate sulla potenziale eco-tossicità di alcuni filtri solari all'ambiente marino e alla salute umana.

La selezione e l'evoluzione naturale hanno assicurato che piante e animali abbiano sviluppato efficaci meccanismi di protezione contro i dannosi effetti collaterali dello stress ossidativo e delle radiazioni ultraviolette (UV).

Numerosi studi hanno infatti dimostrato che i composti naturali hanno effetti fotoprotettivi per la pelle, non solo attraverso l'assorbimento diretto dei raggi UV, ma anche attraverso i loro effetti antiossidanti (come scavenger dei ROS) (Suozzi, 2020) (Ghazi, 2022).

I composti naturali presenti nel mondo vegetale che hanno proprietà schermanti, potrebbero essere presi in considerazione come potenziali ingredienti per la protezione solare in quanto assorbono le radiazioni UV e hanno capacità antiossidanti maggiori rispetto ai filtri sintetici presenti nei prodotti solari.

Le recenti ricerche sull'uso di prodotti naturali, sostengono che le piante sono una ricca fonte di antiossidanti naturali fotoprotettivi e sulla base di ciò sono stati utilizzati dei composti naturali (acidi cinnamici del propoli, polifenoli del tè, le proantocianidine dei semi d'uva, i polifenoli del lichene e la lignina sono solo degli esempi) per le formulazioni dei protettivi solari, fornendo nuove opzioni (Saewan, 2015).

È stato dimostrato, ad esempio, che trattando i fibroblasti umani con un estratto grezzo di *Angelica archangelica*, il cui composto principale è l'acido clorogenico, subito dopo l'irraggiamento si aveva una riduzione dei ROS rispetto alle cellule non trattate con questo composto (Sun, 2016).

Un altro composto studiato è il rooibos (*Aspalathus linearis*), le cui foglie sono ricche di aspalatina, un polifenolo in grado di prevenire un eccessivo stress ossidativo generato dall'accumulo di ROS. In un modello di cheratinociti *in vitro*, è stato dimostrato che gli estratti del rooibos prevengono l'accumulo di fotodanneggiamento modulando indirettamente la risposta infiammatoria (Magcwebeba, 2016). I risultati hanno mostrato che questi estratti erano stati in grado di inibire l'accumulo dell'IL-1 $\alpha$  pro-infiammatoria e di promuovere l'eliminazione delle cellule che avevano livelli troppo alti di IL-1 $\alpha$ , tramite apoptosi.

Anche l'Honeybush è ricco di polifenoli che hanno elevate proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. È stato visto che la somministrazione topica dell'estratto grezzo di questa pianta, ha permesso di inibire l'edema indotto da UVB in uno studio condotto sui topi (Saric and Sivamani, 2016).

A tal proposito in questo studio è stata presa in considerazione l'Honeybush (*Cyclopia spp.*), da cui sono stati ricavati alcuni estratti ricchi di benzofenoni e xantoni con lo scopo di testare il loro eventuale potere fotoprotettivo, finora inesplorato.

Il presente studio è stato quindi rivolto ad indagare le proprietà fotoprotettive di ARCOP26, ARC2028 e BEF1, per valutare se fossero dei candidati adeguati da poter utilizzare nella prevenzione contro il danno indotto dai raggi UVA.

In conclusione, dai risultati ottenuti si può affermare che gli estratti di Honeybush risultano essere dei buoni fotoprotettori, in quanto: a) assorbono nella zona dell'UV appropriata per schermare sia raggi UVA che UVB; b) sono altamente fotostabili; c) proteggono macromolecole biologiche quali lipidi e proteine contro il danno indotto dai raggi UVA; d) proteggono contro la produzione di ROS mitocondriali in fibroblasti di derma umano indotti dall'esposizione ai raggi UVA; e) agiscono sia da schermanti di raggi UV sia come antiossidanti.

Questi risultati preliminari ed interessanti rappresentano quindi uno stimolo per proseguire con ulteriori indagini al fine di confermare i dati finora ottenuti.

La finalità è quella di poter utilizzare in futuro questi composti naturali per sostituire, anche parzialmente, alcuni filtri sintetici presenti nella maggior parte delle creme solari in commercio.

## BIBLIOGRAFIA

Ajuwon OR, Ayeleso AO, Adefolaju GA. The Potential of South African Herbal Tisanes, Rooibos and Honeybush in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Molecules*, 23(12):3207, 2018.

Aker AM, Watkins DJ, Johns LE, Ferguson KF, Soldin OP, Del Toro LV, Alshawabkeh AN, Cordero JF, Meeker JD. Phenols and parabens in relation to reproductive and thyroid hormones in pregnant women. *Environmental Research*, 151:30-37, 2016.

Araji S, Grammar TA, Gertzen R, Anderson SD, et al. Novel Roles for the Polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut, *Plant Physiol*, 154(3):1191-1203, 2014.

Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanism of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014:360438, 2014.

Barolet D, Christiaens F, Hamblin MR. Infrared and skin: Friend or foe, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 155:78-85, 2016.

Berenbeim JA, K Wong NG, Cockett MCR, Berden G, Oomens J, Rijs AM, Dessent CEH. Unravelling the keto-enol tautomer dependent photochemistry and degradation pathways of the protonated UVA filter avobenzene, *The Journal of Physical Chemistry*, 124(15):2919-2930, 2020.

Briganti S, Picardo M, Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 17(6):663-9, 2003.

Buck Louis GM, Maisog J, Sapra KJ, Kannan K. Urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet radiation filters and couples' fecundity, *American Journal of Epidemiology*, 180(12):1168-75, 2014.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation, *Methods in enzymology*, 52:302-10, 1978.

Burnett ME, Hu JY, Wang SQ. Sunscreens: Obtaining adequate photoprotection, *Dermatologic Therapy*, 25(3): 244-51, 2012.

Campanini M O M, Napoleao Tavares R S, Caluz D R E, Gaspar L R, Deboni H M. Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohyphoxylon stygium*, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 178:316-322, 2018.

Chisvert A, Salvador A, Lopez-Nogueroles M, Miralles P. Perfumes in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods, *Analysis of Cosmetic Products*, 225-248, 2007.

Corinaldesi C, Marcellini F, Nepote E, Damiani E, Danovaro R. Impact of inorganic UV filters contained in sunscreen products on tropical stony corals (*Acropora* spp.), *Science of the total environment*, 637-638-1285, 2018.

Danovaro R, Corinaldesi C. Sunscreen products increase virus production through prophage induction in marine bacterioplankton, *Microbial Ecology*, 45(2):109-18, 2003.

Danovaro R, Bongiorno L, Corinaldesi C, Giovannelli D, Damiani E, Astolfi P, Greci L, Pusceddu A. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental Health Perspectives*, 116(4):441-2, 2008.

da Silva A C P, Paiva J P, Diniz R R, Dos Anjos V M, Silva A B S M, Pinto A V, Dos Santos E P, Leitao A C, Cabral L M, Rodrigues C R, de Padula M, Santos B A M C. Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: In vitro and in silico approach for improved sunscreens, *Journal of photochemistry and photobiology*, 193:162-171, 2019.

Deng Y, Ediriwickrema A, Yang F, Lewis F, Lewis J, Girardi M, Saltzamn W M. A sunblock based on bioadhesive nanoparticles, *Nat Mater*, 14(12):1278-85, 2015.

Dickinson R E. Land-atmosphere interactions, *Encyclopedia of Atmospheric Sciences*, 917-922, 1995.

DiNardo J C, Downs C A. Dermatological and environmental toxicological impact of the sunscreen ingredient oxybenzone/benzophenone-3, *Journal of Cosmetic dermatology*, 17(1):15-19, 2018.

D'orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin, 14(6):12222-48, 2013.

Douki T, Leccia MT, Beani JC, Mouret S, Cadet J, Favier A. Harmful effects of solar UVA radiation: new indices in DNA, *Medecine Sciences*, 23(2):124.6, 2007.

Du Y, Wang W-Q, Pei Z-T, Ahmad F, Xu R-R, Zhang Y-M, Sun L-W. Acute Toxicity and Ecological Risk Assessment of Benzophenone-3 (BP-3) and Benzophenone-4 (BP-4) in Ultraviolet (UV)-Filters, *Int J Environ Res Public Health*, 14(11):1414, 2017.

Elmets CA. Benzophenone-3: A Potential Cause in Individuals with Undiagnosed Dermatitis, *Environ Sci Technol*, 2014.

Fediuk DJ, Wang T, Raizman JE, Parkinson FE, Gu X. Tissue deposition of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone from repeated topical skin applications in rats, *International journal of toxicology*, 29(6):594-603, 2010.

Flament F, Bazin R, Laquieze S, Rubert V, Simonpietri E, Piot B. Effect of the sun on visible clinical signs of aging in Caucasian skin, *Clinical Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6:221-32, 2013.

Gabros S, Nessel T A, Zito P M. Sunscreens and photoprotection, 2022.

Garza ZCF, Born M, Hilbers PAJ, van Riel NAW, Liebmann J. Visible Blue Light Therapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities, *Current Medicinal Chemistry*, 25(40):5564-5577, 2018.

Giokas DL, Salvador A, Chisvert A. UV filters: From sunscreens to human body and the environment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5):360-374, 2007.

Ghazi S. Do the polyphenolic compounds from natural products can protect the skin from ultraviolet rays?, *Results in chemistry*, 4,1000428, 2022.

Glanz K, Kwong P L, Avelis J, Cassel K. Development of a survey of sunscreen use and attitudes among adults in two coastal states, 2019, *International Journal of environmental Research and Public Health*,19(5):2677, 2022.

Giacomoni P U. Appropriate technologies to accompany sunscreens in the battle against ultraviolet, superoxide, and singlet oxygen, *Antioxidants*, 9(11):1091, 2020.

Harrison G I, Young A R. Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin,*Methods*, 28(1):14-9, 2002.

Haghdoost S, Svoboda P, Näslund I, Harms-Ringdahl M, Tilikides A, Skog S. Can 8-oxo-dG be used as a predictor for individual radiosensitivity? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 50(2):405-10, 2001.

Heurung AR, Raju SI, Warshaw EM. Adverse reactions to sunscreen agents: epidemiology, responsible irritants and allergens, clinical characteristics, and management, *Dermatitis*, 25(6):289-326, 2014.

Heurung AR, Raju SI, Warshaw EM. Benzophenones, *Dermatitis*, 25(1):3-10, 2014.

Im AR, Yeon SH, Lee JS, Um KA, Ahn YJ, Chae S. Protective effect of fermented *Cyclopia intermedia* against UVB-induced damage in HaCaT human keratinocytes. *BMC Complement Altern Med.* 16:261, 2016.

Jesus A, Sousa E, Cruz MT, Cidade H, Lobo JMS, Almeida IF. UV Filters: Challenges and Prospects, *Pharmaceuticals*, 15(3):263, 2022.

Jones D P. Radical-free biology of oxidative stress, *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(4):C894-68, 2008.

Joubert E, Gelderblom WCA, Louw A, de Beer D. South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides*—A review, *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3),376-412, 2008.

Joubert E, Otto F, Gruner S, Weinreich B. Reversed-phase HPLC determination of mangiferin, isomangiferin and hesperidin in *Cyclopia* and the effect of harvesting date on the phenolic composition of *C. genistoides*, *European Food Research and Technology*, 216,270-273, 2003.

Juzeniene A, Moan J, Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production, *Dermato-Endocrinology*, 4(2):109-17, 2012.

Kauffman ME, Kauffman MK, Traore K, Zhu H, Trush MA, Jia Z, Li YR. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive Oxygen Species*, 2(5):361-370, 2016.

Klopcic I, Sollner Dolenc M. Endocrine Activity of AVB, 2MR, BHA, and Their Mixtures, *Toxicological Sciences*, 156,(1):240–251, 2017.

Kockler J, Oelgemoller M, Robertson S, Glass B D. Photostability of sunscreens, *Journal of photochemistry and photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13(1):91-110, 2012.

Kojić M, Petković M, Etinski M. A new insight into the photochemistry of avobenzene in gas phase and acetonitrile from ab initio calculations, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18(32):22168-78, 2016.

Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Honeybush (*Cyclopia* sp.) - a rich source of compounds with high antimutagenic properties, *Fitoterapia*, 80(1):3-11. 2009.

Krause M, Frederiksen H, Sundberg K, et al. Maternal exposure to UV filters and associations to maternal thyroid hormones and IGF-I/IGFBP3 and birth outcomes, *Endocrine Connections*, 7(2):334-346, 2018.

Kullavanijaya P, Lim H W. Photoprotection, *J Am Acad Dermatol.*, 52(6):937-58, 2005.

Kunisue T, Chen Z, Buck Louis GM, et al. Urinary concentrations of benzophenone-type UV filters in U.S. women and their association with endometriosis, *Environ Sci Technol*, 46(8):4624-32, 2012.

Latha MS, Martis J, Shobha V, Sham Shinde R, Bangera S, Krishnankutty B, Bellary S, Varughese S, Rao P, Naveen Kumar BR. Sunscreening agents: a review, *J Clin Aesthet Dermatol.* 6(1):16-26, 2013.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186:464-78, 1990.

Lhiaubet-Vallet V, Marin M, Jimenez M, Gorchs O, Trullas C, Miranda MA. Filter-filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen, *Photochem Photobiol Sci,* 9(4):552-8, 2010.

Li Y, He Y, Lam CH, Nah T. Environmental photochemistry of organic UV filter butyl methoxydibenzoylmethane: Implications for photochemical fate in surface waters, *Science of the total Environment,* 839:156145, 2022.

Lushchak V I. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms, *72(8):809-27,* 2007.

Lushchak V I. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes, *Acta biochimica Polonia,* 53(4):679-84, 2006.

Magcwebeba TU, Swart P, Swanevelder S, Joubert E, Gelderblom WCA. In Vitro Chemopreventive Properties of Green Tea, Rooibos and Honeybush Extracts in Skin Cells, *Molecules,* 21(12):1622, 2016.

Marnewick JL, van der Westhuizen FH, Joubert E, Swanevelder S, Swart P, Gelderblom WC. Chemoprotective properties of rooibos (*Aspalathus linearis*), honeybush (*Cyclopia intermedia*) herbal and green and black (*Camellia sinensis*)

teas against cancer promotion induced by fumonisin B1 in rat liver, *Food Chem Toxicol*, 47(1):220-9, 2009.

Mao JF, Li W, Ong CN, He Y, Jong M-C, Gin KT-H. Assessment of human exposure to benzophenone-type UV filters: A review, *Environment International*, 167, 2022.

Martin N, Wassmur B, Slomberg D, Labille J, Lammel T. Influence of TiO<sub>2</sub> nanocomposite UV filter surface chemistry and their interactions with organic UV filters on uptake and toxicity toward cultured fish gill cells, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 243:113984, 2022.

Matts PJ, Alard V, Brown MW, Ferrero L, Gers-Barlag H, Issachar N, Moyal D, Wolber R. The COLIPA in vitro UVA method: a standard and reproducible measure of sunscreen UVA protection, *International Journal of Cosmetic Science*, 32(1):35-46, 2010.

McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity of South African herbal teas: rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*), *Phytother Res*. 21(1):1-16, 2007.

Miller N, Malherbe C J, Joubert E. In vitro  $\alpha$ -glucosidase inhibition by honeybush (*Cyclopia genistoides*) food ingredient extract—potential for dose reduction of acarbose through synergism, *Food & Function*, 11(7):6476-6486, 2020.

Modenese A, Korpinen L, Gobba F. Solar Radiation Exposure and Outdoor Work: An Underestimated Occupational Risk, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15(10):2063, 2018.

Morocho-Jácome AL, Freire TB, de Oliveira AC, de Almeida TS, Rosado C, Velasco MVR, Baby AR. In vivo SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds-A review, *J Cosmet Dermatol*. 20(3):729-737, 2021.

Mturi G J, Martincigh B S. Photostability of the sunscreensing agent 4- tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzene) in solvents of different polarity and proticity, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 200(2-3):410-420, 2008.

Mylonas C, Kouretas D, Lipid peroxidation and tissue damage, *In Vivo*, 13(3):295-309, 1999.

Narayanan D, Saladi R N, Fox J L. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer, *International Journal of dermatology*, 49(9):978-86, 2010.

Nash JF. Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products, *Dermatol Clin*. 24(1):35-51, 2006.

Nash J F, Tanner P R. Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety, *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 30(2-3):88-95, 2014.

Osterwalder U, Sohn M, Herzog B. Global state of sunscreens, *Photodermatology, photoimmunology & Photomedicine*, 30(2-3):62-80, 2014.

Palella R, Na-Young Y, Kim SK. Anti-photoaging and Photoprotective Compounds Derived from Marine Organisms, *Mar. Drugs*, 8(4):1189-202, 2010.

Palm M D, O'Donoghue M N. Update on photoprotection, *Dermatologic Therapy*, 20(5):360-376, 2007.

Petrova A, Davids L M, Rautenbach F, Marnewick J L. Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice, *Journal of Photochemistry and photobiology*, 103(2):126-139, 2011.

Ray PD, Huang Bo-Wen, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cellular Signaling*, 24(5):981-90, 2012.

Rehfeld A, Dissing S, Skakkebæk NE. Chemical UV filters mimic the effect of progesterone on Ca(2+) signaling in human sperm cells, *Endocrinology*, 157(11): 4297-308, 2016.

Rodriguez-Fuentes G, Sandoval-Gio JJ, Arryo-Sliva A, Norena-Barroso E, Escalante-Herrera KS, Olvera-Espinosa F. Evaluation of the estrogenic and oxidative stress effects of the UV filter 3-benzophenone in zebrafish (*Danio rerio*) eleuthero-embryos, *Ecotoxicol Environ Saf*, 115:14-8, 2015.

Saewan N, Jimtaisong A. Natural products as photoprotection, *Journal of cosmetic Dermatology*, 14(1):47-63, 2015.

Salo DC, Pacifici RE, Giulivi C, Davies KJ. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation, *Journal of biological chemistry*, 265(20):11919-27, 1990.

Saric S, Sivamani RK. Polyphenols and Sunburn, *Int J Mol Sci*, 17(9):1521, 2016.

Serpone N. Sunscreens and their usefulness: have we made any progress in the last two decades?, *Photochem Photobiol Sci*, 20(2):189–244, 2021.

Shalko S, Silva Dos Reis VM. Sun protection factor: meaning and controversies, *Anais Brasileiros dermatologia*, 86(3):507-15, 2011.

Shamin SI. Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment; *Advances in experimental medicine and biology*, 2017.

Schulz H, Joubert E, & Schutze W. Quantification of quality parameters for reliable evaluation of green rooibos (*Aspalathus linearis*), *European Food Research and Technology*, 539-543, 2003.

Skórkowska A, Maciejska A, Pomierny B, et al. Effects of combined prenatal and adult benzophenone-3 dermal exposure on factors regulating neurodegenerative processes, blood hormone levels, and hematological parameters in female rats, *Neurotox Res*, 37(3):683-701, 2020.

Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease, *Drug Metabolism Review*, 30(2):225-43, 1998.

Stadtman ER, Protein oxidation and aging, *Free radical research*, 40(12):1250-8, 2006.

Sudprasert W, Navasumrit P, Ruchirawat M. Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209(6):503-11, 2006.

Suitthimeathegorn O, Yang C, Ma Y, Liu W. Direct and Indirect Effects of Blue Light Exposure on Skin: A Review of Published Literature., *Skin Pharmacol Physiol*, 2022.

Suh S, Pham C, Smith J, Mesinkovska NA. The banned sunscreen ingredients and their impact on human health: a systematic review, *Int J Dermatol*, 59(9):1022-1042, 2020.

Sun Z, Hwang E, Park SY, Zhang M, Gao W, Lin P, Yi TH. *Angelica archangelica* Prevented Collagen Degradation by Blocking Production of Matrix Metalloproteinases in UVB-exposed Dermal Fibroblasts, *Photochem Photobiol*, 92(4):604-10, 2016.

Suozzi K, Turban J, Girardi M. Cutaneous Photoprotection: A Review of the Current Status and Evolving Strategies, *Yale J Biol Med*, 93(1):55-67, 2020.

Tawfik ME, Atwater AR. Anaphylactoid reaction to benzophenones, with recurrence during patch testing. *Contact Dermatitis* 81:303-4, 2019.

Warthan MM, Uchida T, Wagner Jr RF. Uv light tanning as a type of substance-related disorder, *Arch Dermatol*, 141(8):963-6, 2005.

Wnuk W, Michalska K, Krupa A, Pawlak K. Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: is it really safe for children and pregnant women? *Postepy Dermatol Alergol*, 39(1):26-33, 2022.

Wnuk A, Rzemieniec J, Litwa E, et al.. Prenatal exposure to benzophenone (BP-3) induces apoptosis, disrupts estrogen receptors expression and alters the epigenetic status of mouse neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol* 182: 106-18, 2018.

Yan Liang-Jun, Protein Redox Modification as a Cellular Defense Mechanism against Tissue Ischemic Injury, *Oxid Med Cell Longev*, 2014:343154, 2014.

Yarovaya, L., Waranuch N, Wisuitiprot, W, Khunkitti W. Effect of grape seed extract on skin fibroblasts exposed to UVA light and its photostability in sunscreen formulation. *J. Cosmet. Dermatol.* 20(4):1271–1282, 2020.

Young R. Antony, Acute effects of UVR on human eyes and skin, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Volume 92, Issue 1, 2006

Zielonka J, Srinivasan S, Hardy M, Ouari O, Lopez M, Vasquez-Vivar J, Avadhani NG, Kalyanaraman B. Cytochrome c-mediated oxidation of hydroethidine and mito-

hydroethidine in mitochondria: identification of homo- and heterodimers, *Free Radic Biol Med*, 44(5):835-46, 2008.

Zhong X, Li Y, Che X, et al. Significant inhibition of photosynthesis and respiration in leaves of *Cucumis sativus* L. by oxybenzone, an active ingredient in sunscreen. *Chemosphere*, 219:456-62, 2019.

## SITOGRAFIA

<https://www.informazioneambiente.it/radiazione-solare-energia-green/>

[https://www.isac.cnr.it/dinamica/davolio/tmp/Didattica/dispense\\_radiazione.pdf](https://www.isac.cnr.it/dinamica/davolio/tmp/Didattica/dispense_radiazione.pdf)

Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, maggio 2002

<https://www.cosmetimag.it/danno-ossidativo/> 2021

<https://www.grupposandonato.it/news/2021/febbraio/fototerapia-come-funziona>

<https://www.humanitas.it/enciclopedia/vitamine/vitamina-d/>

<https://www.digikey.com/en/articles/ultraviolet-radiation-attributes-and-benefits>

<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1304-positive-and-negative-effects-of-uv>

<https://www.ederma.net/micosi-fungoide-trattamento-fototerapia>

<https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/topics/uvfilters/index.html#top>

<https://www.cosmeticsdesign-europe.com/Article/2019/08/19/Sunscreen-regulations-in-the-world-from-European-Union-USA-Canada-to-China>

Commission Regulation (EU) 2017/238 of 10 February 2017 amending Annex VI to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products C/2017/0716; <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/238/oj>.

Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use, in Federal Register, Food and Drug Administration, HHS. 2019: 6204-75; 84 FR 6204

<https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/update-sunscreen-requirements-deemed-final-order-and-proposed-order>