



UNIVERSITÀ  
POLITECNICA  
DELLE MARCHE

# Dipartimento di Scienze della Vita e dell' Ambiente

## Corso di Laurea in Scienze Biologiche

*“ Fotostabilità dei filtri UV cosmetici sulla pelle di mammiferi esposti ai raggi UV “*

*“ Photostability of Cosmetic UV Filters on Mammalian Skin Under UV Exposure ”*

*Tesi di Laurea di:*

*Alessandra La Contana*

*Relatrice:*

*Elisabetta Damiani*

*Anno Accademico 2019/2020*

# RAGGI UV



- UVB:  $\lambda = 280-320$  nm
- UVA:  $\lambda = 320-400$  nm
- UVC:  $\lambda = 270$  nm

- Eritema solare (UVB)
- Fotoinvecchiamento (UVA)
- Fotocarcinogenesi (UVB e UVA sono IMMUNOSOPRESSORI, correlati al danno al DNA e insorgenza di tumori)

## FILTRI SOLARI

- Octocrilene (OCR)
- Butil metossidibenzoilmetano (BM-DBM)
- Benzofenone-3 (BP-3)
- Etilsil salicilato (EHS)
- Etilsil metossicinnamato (EHMC)
- Etilsil triazone (EHT)



### EFFICACIA SOSTENUTA DA DIVERSI INDICATORI:

- ✓ Un elevato fattore di protezione solare SPF (MED cute protetta/MED cute non protetta)
- ✓ Una protezione UVA/UVB ben bilanciata
- ✓ Un' elevata FOTOSTABILITA' (capacità di mantenere inalterato il proprio potere protettivo, ovvero la sua integrità spettrale) dei filtri UV utilizzati



# MATERIALI E METODI

## IN VITRO:



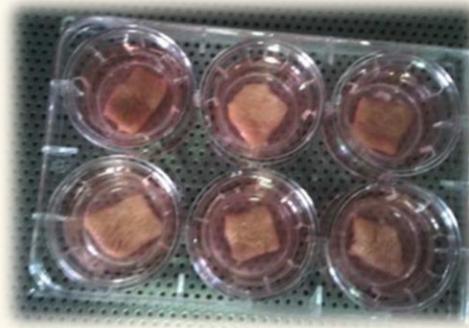
## PRO

- Evitano le preoccupazione etiche
- Forniscono risultati riproducibili
- Veloci ed economici

## CONTRO

- Parametri che influenzano i risultati
  - Sorgente di radiazione
  - Quantità esatta da applicare (2 mg/cm<sup>2</sup>)
  - Distribuzione del campione
- Uso di materiali di substrato inerti
- Non si tiene conto delle reazioni e dei processi che vengono attribuiti a diversi costituenti della pelle

## EX VIVO:



- Tessuti di organismi in condizioni più controllate
- Alternativa ai modelli animali
- Più affidabile del metodo *in vitro*

- Meno economici
- Tessuti con risposte integrate parziali
- Non rispettano gli eventi esatti che si verificano *in vivo*

- 15 Preparati solari
- 7 Prodotti per la cura personale
- Orecchie di maiale
- Soluzione standard
- Suntest CPS+
- HPLC

## FORMULAZIONE 1:

- BM-DBM (50 mg)
- OCR (150 mg)
- EHS (80 mg)

## FORMULAZIONE 2:

- BP-3 (100 mg)
- EHMC (90 mg)
- EHT (40 mg)



# STRUMENTI

Il **SUNTEST CPS+** è un simulatore solare, utilizzato per verificare i cambiamenti di proprietà dei materiali causati dalla luce solare, dalla temperatura e dall'umidità in un breve periodo di tempo.

## IMPOSTAZIONI:

- Irraggiamento 350 W
- Temperatura di ventilazione 33 ° C
- Irradiazione con  $\lambda = 280-400$  nm

**HPLC** è un tipo di cromatografia liquida che permette di separare due o più composti presenti in un solvente.

## IMPOSTAZIONI:

- Irradiazione con  $\lambda = 500$  nm
- Elaborazione dei dati eseguita dal software della ChemStation Agilent



- BM-DBM, OCR, EHS, BP-3, EHMC esecuzione di 14 minuti
- EHT esecuzione di 30 minuti

# MISURAZIONE HPLC

Sono state prese 3 aliquote dalle FORMULAZIONI 1 e 2, aggiunti:

- 10 mL di soluzione standard interna in fiale di vetro

Estrazione con 10 mL di Acetonitrile sotto Sonicazione (5 min) a 35 kHz

Centrifugazione (5 min) a 2500 g

Filtrazione del surnatante

Analisi del surnatante mediante HPLC

Campioni di creme solari commerciali e prodotti per la cura della pelle, sono stati sottoposti e analizzati con le stesse metodiche

# SPERIMENTAZIONI SU PELLE DI SUINO

## PREPARAZIONE PELLE SUINA:

- Pelle tagliata in pezzi (2 x 2 cm<sup>2</sup>)
- Congelamento a -20 °C
- Rimozione membrana cutanea esterna (derma e epidermide) dalla cartilagine



Orecchie di suino senza danni macroscopicamente visibili

## PROVA PRELIMINARE PER LA DETERMINAZIONE DEL SOLVENTE PIU' ADATTO:

Applicate uniformemente FORMULAZIONE 1 e 2, su campioni PELLE DI SUINO



Lasciati 30 min al buio



Trasferimento in provette con aggiunta di:

- Soluzione standard interna
- Acetonitrile
- Etanolo
- Dimetilsolfossido o una miscela di H<sub>2</sub>O/ etanolo 1:1 v/v

- Centrifugazione
- Sonicazione
- Analisi del surnatante tramite HPLC

# CONFRONTO TRA PELLE SUINA E PIASTRE DI VETRO

## METODO ANOVA

Distribuite uniformemente su entrambi i campioni:

- Formulazione 1 e 2
- Creme solari commerciali, prodotti per la pelle (8 mg)



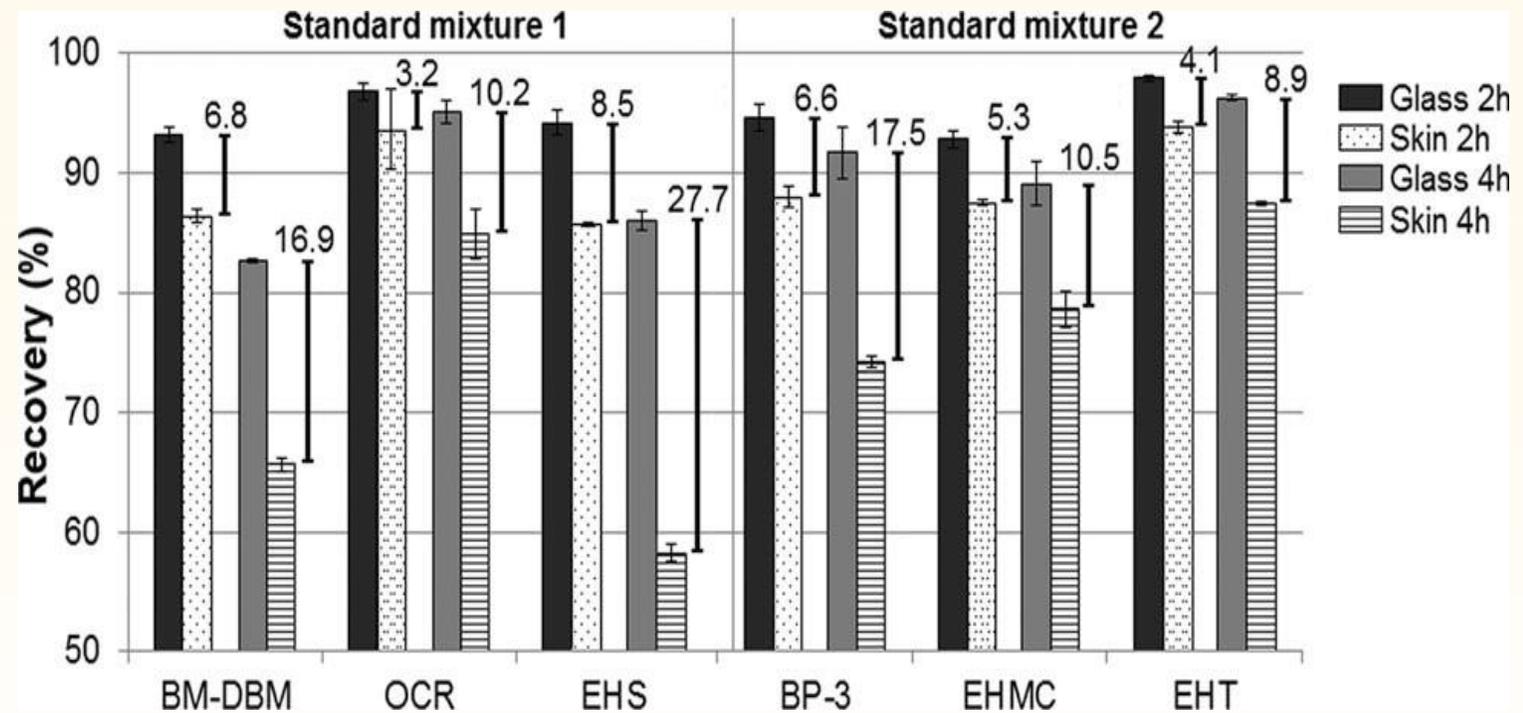
Campioni trasferiti su piastre di Petri con film di Polietilene



Dopo 30 minuti, irradiazione per 0 min , 30 min , 60 min , 120 min e 240 min

- Centrifugazione
- Sonicazione
- Analisi del surnatante tramite HPLC

Valutate le differenze nei recuperi per ciascun Filtro UV



Recuperi dei filtri UV applicati con due miscele standard da vetro e pelle di maiale dopo 2 e 4 h di irradiazione

Sono state ottenute curve di calibrazione lineare per: BM-DBM, BP-3, EHMC, EHS, ORC, e EHT nell'intervallo di concentrazione 2,5 – 140 mg/L

# DETERMINAZIONE DEI FILTRI UV NEI PRODOTTI COMMERCIALI E CURA DELLA PELLE

	Main protection range		Active ingredients of the 15 investigated sunscreens and 7 skin care products, UV filter amount in g per 100 g																					
	UVA	UVB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
BM-DBM	x		2.6	3.0	7.1	4.2	3.6	4.0	2.6	4.9	0.4	4.2	2.6	2.9	1.2	2.3	3.1	1.6	1.3	2.0	1.3	0.2	1.1	
OCR		x	9.9	6.4	9.9	10.1	4.7	5.5	6.5	8.3		3.9	5.9	10.0	6.4	5.8	9.2	3.0			1.4			
EHS		x			4.2		2.2	2.8		4.3					4.0	2.9				2.5				
EHMC		x																				2.3	5.5	
EHT		x									1.1								2.7					
BP-3	(x)	x											5.9											
Further UV filters in the products, according to the respective INCI declaration:																								
TiO <sub>2</sub>		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x	x	x	x						x	
TDSA	x		x																					
BEMT	x	x		x		x			x			x	x											
PBSA		x			x																	x	x	
Homosalate		x											x											
SPF			30	50+	10	30	25	30	30	30	6	20	15	20	30	25	15	6	n.s.	n.s.	6	n.s.	n.s.	n.s.

TDSA = Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid; n.s. = not specified; BEMT = Bis-Ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine; PBSA = Phenylbenzimidazole sulfonic acid.

Combinazione di Filtri UV e SPF dei campioni testati

A diverse concentrazioni, i Filtri UV più rilevati:

- BM-DBM
- OCR

Intervalli di concentrazione dei filtri UV nei prodotti:

BM-DBM	ORC	EHS	EHT	EHMC	BP-3
0.2-7.1%	1.4-10.1%	2.2-4.3%	1.1-2.7%	2.3-5.5%	0.7-5.9%

# RECUPERI DEI FILTRI UV DOPO IRRADIAZIONE STIMA DELLA FOTOSTABILITA'

## FOTOSTABILITA'

- EHT, OCR e BP-3, hanno buona fotostabilità con recuperi medi > 85% dopo 4 ore di irradiazioni



BM-BDM + OCR, mostrano una buona fotostabilità

## FOTODEGRADAZIONE

- EHS, BM-DBM e EHMC hanno una fotodegradazione più elevata



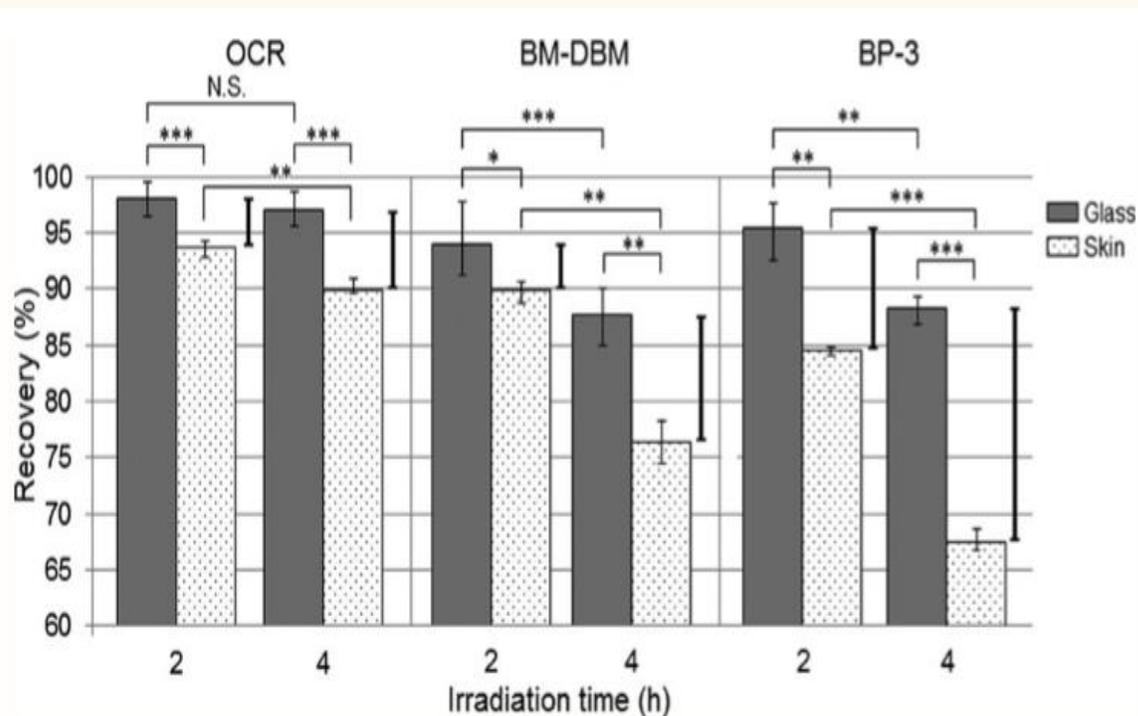
## RISULTATI

EHMC + BM-DBM, alta fotodegradazione di entrambi i filtri UV (EHMC, recuperi medi del 69% e 48% dopo 2 e 4 ore di irradiazione; BM-DBM recuperi medi del 15% dopo 2 ore, dopo 4 ore, fotodegradazione completa)

BM-DBM + EHT, recuperi medi del solo 26% e 43% per BM-DBM dopo un tempo di irradiazione di 4 ore

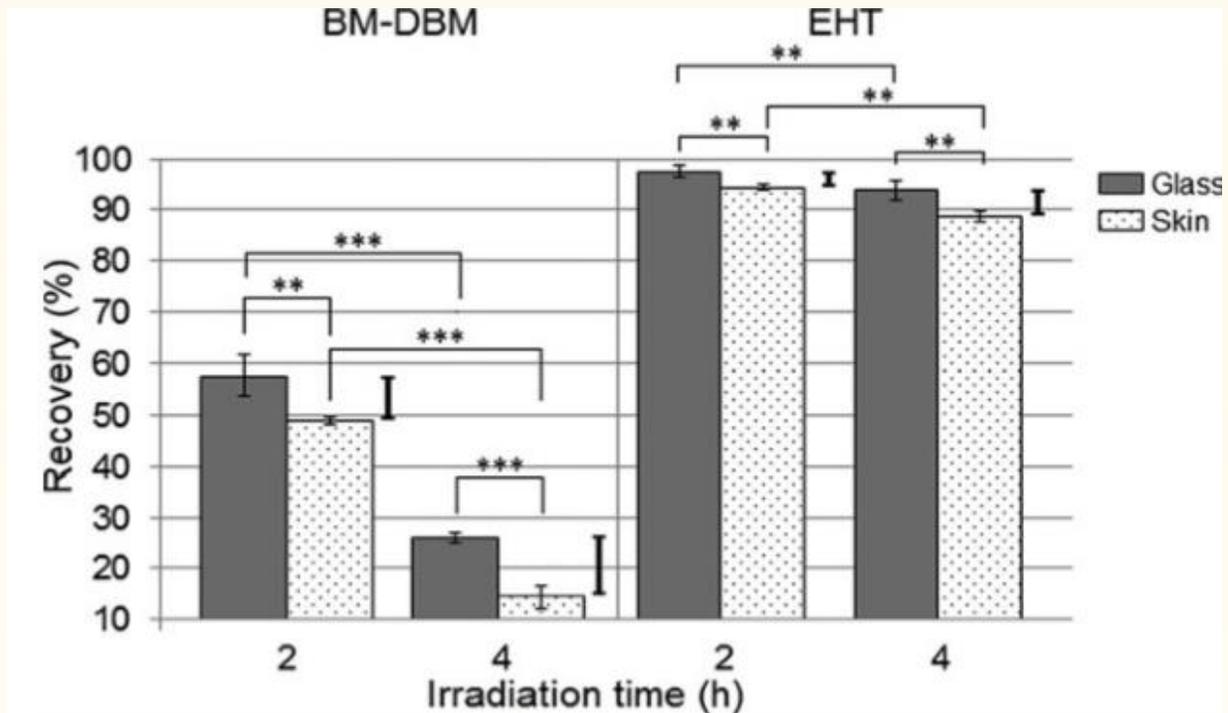
BM-DBM + EHS, recuperi medi solo del 26% del BM-DBM iniziale dopo 4 ore di irradiazione

# DIVERSI RECUPERI DEI FILTRI UV DEI PRODOTTI COMMERCIALI DOPO IRRADIAZIONE ESTRATTI DA PIASTRE DI VETRO E PELLE



## Campione di protezione solare n. 11

- OCR, minime differenze nei recuperi della pelle, per quanto riguarda i recuperi delle lastre di vetro alcuna differenza statisticamente significativa dopo 2 e 4 ore di irradiazione, buona **foto stabilità**
- BM-DBM e BP-3, una certa **foto degradazione** di circa il 5% e il 12% dopo 2 e 4 ore di irradiazione, rispettivamente



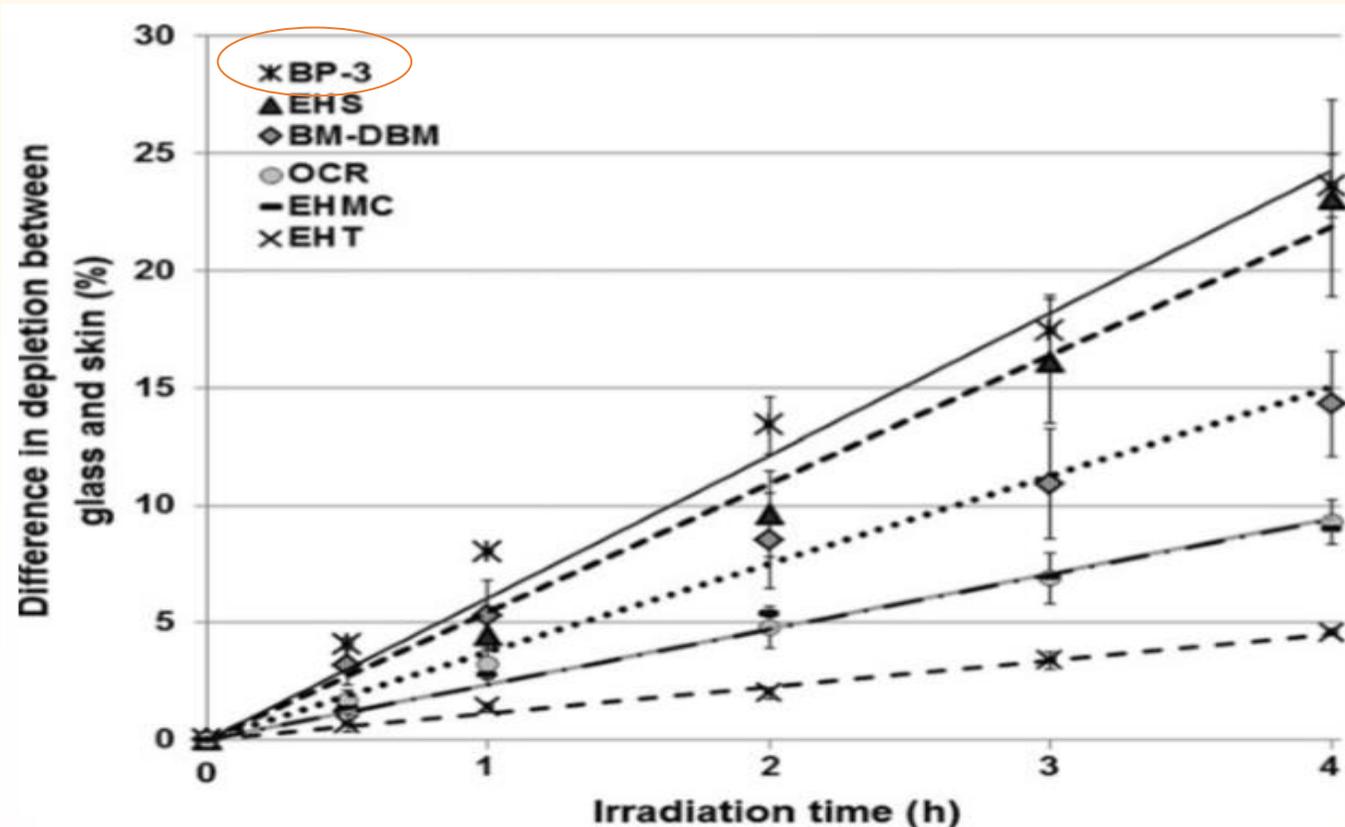
## Campione di protezione solare n. 17 (Crema viso)

- EHT, meno reattivo buona **foto stabilità**
- BM-DBM, reattività significativa ma soprattutto un' elevata **foto degradazione** di circa il 75% dopo 4 ore irradiazione

# DIFFERENZE NELL'ESAURIMENTO DEI FILTRI

Considerando la media aritmetica dei recuperi del filtro UV per i diversi campioni commerciali esaminati:

- BP-3 ha mostrato le maggiori differenze tra i recuperi calcolati dalle lastre di vetro e dalla pelle
- EHMC ed EHT mostrano la reattività più bassa nei confronti della pelle suina, il che è in buona conformità con i risultati dello screening HPLC; lo stesso vale per l'OCR



Differenze medie nell'esaurimento dei filtri UV per i campioni commerciali oggetto di studio sulla pelle suina e lastre di vetro dopo diversi tempi di irradiazione

In ulteriori studi, il filtro solare OCR ha mostrato maggiore affinità di legame per le catene laterali di amminoacidi:

- Etanolamina
- Butilamina
- BSA
- Gelatina

Le diverse combinazioni di filtri UV, la fotostabilità e la composizione complessiva dei prodotti possono influenzare i rispettivi risultati.

# CONCLUSIONI

Questo studio mostra :

- Le differenze crescenti tra i recuperi del vetro e della pelle indicano il verificarsi di alcune reazioni tipiche della pelle, come la formazione di addotti proteici.
- notevoli differenze dei filtri UV nella loro reattività verso la pelle, elencate in ordine decrescente:  
BP-3 > EHS > BM-DBM > OCR > EHMC > EHT
- Fotodegradazione parzialmente elevata dei filtri UV inclusi nei prodotti per l'assistenza diurna



I prodotti della fotodegradazione reagiscono con le proteine della pelle e possono provocare sensibilizzazione cutanea



**!** Risulta quindi necessario associare gli studi *in vivo* ai modelli *in vitro*, in quanto questi ultimi seppur validi per predirne gli effetti, possono fornire risultati che non rispecchiano la situazione reale.