

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
DIPARTIMENTO DI FARMACIA
LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA
FARMACEUTICHE

Fotoprotezione UV: valutazione comparativa tra emulsioni e
nanoemulsioni contenenti filtri solari

Candidata

Francesca De Gaetano

Relatrice: Prof.ssa Eleonora Russo

Correlatrice: Prof.ssa Carla Villa

Correlatore: Prof. Philippe Piccerelle

Anno Accademico 2021-2022

INDICE

INTRODUZIONE	3
Natura della radiazione ultravioletta	3
Struttura della pelle e radiazioni solari	5
Filtri solari	6
Nanotecnologie.....	8
Nano-emulsioni	9
OBIETTIVO DELLA TESI	10
PARTE SPERIMENTALE	11
MATERIALI	13
Filtri Solari	13
Octocrylene	13
Butyl methoxydibenzoylmethane (AVOBENZONE).....	14
Ethylhexyl methoxycinnamate (PARSOL MCX).....	15
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (TINOSORB S).....	16
Sostanze Lipofile.....	17
Glyceryl Dibehenate (Compritol 888).....	17
Tensioattivi Emulsionanti.....	17
Poloxamer 188 (Lutrol® F68).....	18
Gelificanti.....	18
Xanthan Gum (Gomma xantana).....	19
METODI	19
Preparazione Emulsioni.....	19
Preparazione Nanoemulsioni: Sonicazione	20
Caratterizzazione delle Emulsioni e Nanoemulsioni.....	21
DLS "Dynamic Light Scattering"	21
Misurazione SPF in Vitro.....	22
RISULTATI e DISCUSSIONE.....	24
Caratterizzazione emulsioni classiche e nanoemulsioni.....	24
CONCLUSIONI.....	34
BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA	35

INTRODUZIONE

Natura della radiazione ultravioletta

Nonostante siamo esposti ad un range ampio di radiazioni, visibili e invisibili, l'esposizione eccessiva ai raggi UV è una delle più dannose per la cute umana. Inoltre, è la radiazione ultravioletta ad attrarre la maggior attenzione clinica, in particolare in relazione all'utilizzo di filtri solari nella prevenzione delle neoplasie cutanee. [1]

Il sole genera radiazioni di varie lunghezze d'onda e frequenze più o meno energetiche; l'insieme di esse compone lo spettro elettromagnetico. La radiazione ultravioletta, che si colloca tra i raggi X e la luce visibile, si divide in tre intervalli di lunghezze d'onda: UVA (320-400nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280nm).

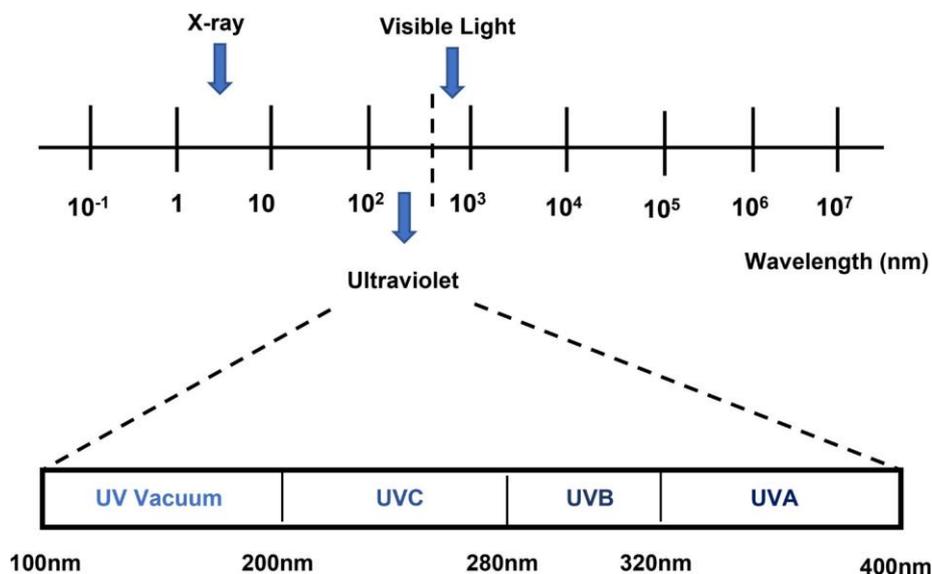


Figura 1: Spettro elettromagnetico della radiazione ultravioletta [1]

Di tutti i raggi solari che raggiungono la terra, a livello del mare, solo il 6% appartiene alla radiazione ultravioletta. La maggior parte rientra nello spettro UVA, (circa il 95,9%) mentre gli UVB costituiscono il 4,1%. Le radiazioni UVC sono bloccate dallo strato di ozono dell'atmosfera. L'energia dei raggi è inversamente proporzionale alla loro lunghezza d'onda; quindi, più è ampia la lunghezza d'onda minore è l'energia della radiazione.

Viceversa, la capacità dei raggi di penetrare la pelle è direttamente proporzionale alla lunghezza d'onda, quindi una radiazione a bassa energia può penetrare la pelle più in profondità rispetto ad una ad alta energia.

Pertanto, gli UVA possono penetrare in profondità l'epidermide fino a raggiungere il derma, mentre gli UVB possono raggiungere solo strati epidermici, fino alla giunzione dermo-epidermica, dove risiedono le cellule basali staminali. Gli UVB sono definiti “starter della melanogenesi” e sono i responsabili della pigmentazione a lungo termine, meccanismo endogeno di difesa alla fotoesposizione. Queste radiazioni stimolano un incremento del numero di melanociti e di melanosomi, i quali vengono prontamente trasferiti nei cheratinociti.

L'UVB è anche il principale responsabile dell'azione eritemigena dei raggi solari che inizia a manifestarsi dopo 6 - 8 ore e raggiunge la massima espressività clinica dopo circa 12 - 24 ore dall'esposizione cutanea. A lungo termine è il diretto responsabile delle neoplasie cutanee, interferendo con il DNA modificandone la velocità di sintesi, che aumenta dopo una depressione iniziale a 12 ore dall'irradiazione, e raggiunge la velocità massima a 48 ore e innescando diversi mediatori, tra cui le prostaglandine.

I raggi UVA sono meno dannosi rispetto agli UVB e sono i principali responsabili del *photoaging*, in quanto a livello dermico stimolano l'iperattività di enzimi metallo dipendenti come elastasi e collagenasi, inducendo un'importante riduzione di collagene ed elastina con conseguenti danni a lungo termine: riduzione della tonicità, secchezza cutanea ed aumento di rughe. Causano inoltre indirettamente danni al DNA attraverso la formazione di diverse specie radicaliche dell'ossigeno contribuendo alla formazione di neoplasie cutanee [2].

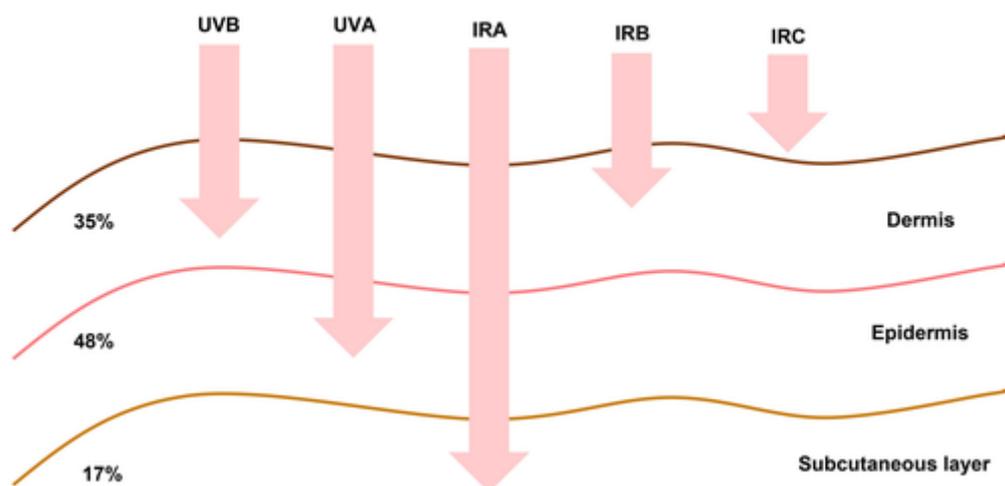


Figura 2: Livello di penetrazione cutanea di diverse radiazioni solari [1]

I prodotti solari sono le preparazioni utili per fornire l'adeguata protezione alle radiazioni UV, grazie alla presenza di filtri UVA ed UVB oltre ad antiossidanti per neutralizzare i radicali liberi

[3,4] e rappresentano lo strumento principale per la prevenzione primaria dei tumori della pelle. Per prodotto solare si intende “qualsiasi preparato (quale crema, olio, gel, spray) destinato ad essere posto in contatto con la pelle umana, al fine esclusivo o principale di proteggerla dai raggi UV assorbendoli, disperdendoli o mediante rifrazione” [5].

Il prodotto solare deve garantire una protezione contro UVA e UVB, con filtri solari il cui rapporto tra i due tipi di radiazioni deve essere almeno pari a 1/3, in un range tra 280 e 400 nm, così da poter garantire un’opportuna protezione.

Struttura della pelle e radiazioni solari

La pelle è costituita da tre strati: epidermide, derma e strato sottocutaneo.

L'epidermide, spessa 50-100 micron, si divide in epidermide non vitale (o strato corneo) ed epidermide vitale: lo strato corneo (10-15 micron) è lo strato più esterno ed è la prima barriera tra l’organismo e l’ambiente esterno [6]; l’epidermide vitale (circa 70 micron) si divide a sua volta in quattro strati: strato lucido (o strato vitale esterno), strato granuloso, strato spinoso e strato basale. [7] Lo strato basale il più vicino al derma include vari tipi di cellule staminali. Tra queste troviamo i cheratinociti che sono i responsabili della produzione della cheratina, importante proteina strutturale, i melanociti, che sintetizzano la melanina, cellule di Langerhans, che contengono l’APC (antigen-presenting cell) e le cellule di Marker che contengono neuroni sensitivi e recettori sensoriali per il dolore e per la pressione meccanica [8].

A livello dell'epidermide si apprezzano la maggior parte dei melanomi che si possono classificare in due tipi: melanomi maligni e melanomi benigni. Sempre a questo livello i carcinomi più comuni sono: il carcinoma delle cellule basali (BCC), che rappresenta il 75% dei casi, e il carcinoma delle cellule squamose (SCC), in entrambi i casi interessano i cheratinociti dell'epidermide. [9]

Il derma (3-5 mm), è lo strato più spesso della pelle, è metabolicamente attivo e costituisce il principale sito dove avviene il processo di guarigione da eventuali lesioni. [10,11]

Questo è possibile perché il derma è costituito sia di tessuto connettivo che di vasi sanguigni, il che lo rende anche target per l’assorbimento transcutaneo.

Nonostante sia necessario, per la maggior parte dei farmaci, raggiungere il derma per essere assorbiti, questo strato contiene vari enzimi quali, esterasi, peptidasi e idrogenasi, che aumentano l'attività metabolica della pelle, riducendo di conseguenza la biodisponibilità dei principi attivi.

Al di sotto del derma troviamo l’ipoderma che rappresenta il tessuto sub-cutaneo e ospita i vasi sanguigni e il tessuto connettivo. [7]

Filtri solari

I filtri agiscono a livello della superficie cutanea e forniscono protezione solare attraverso i fenomeni di assorbimento, riflessione e diffrazione. [12]

L'elenco dei filtri UV autorizzati all'interno dei prodotti cosmetici sono contenuti nell'allegato VI del Regolamento CE 1223/2009, le cui disposizioni si applicano a partire dal 11 luglio 2013. L'allegato contiene 30 filtri autorizzati (2 inorganici e 28 organici) di cui sono indicati limiti e condizioni alle quali possono essere impiegati. [13]

FILTRI INORGANICI:

Titanio Biossido

Titanio Biossido nanoparticellato

Zinco Ossido

Zinco Ossido nanoparticellato

FILTRI ORGANICI (UVA)

Derivati del benzofenone

Derivati dei dibenzoilmetano

FILTRI ORGANICI (UVB)

Derivati dell'acido para-amminobenzoico;

Derivati dell'acido salicilico;

Derivati dell'acido cinnamico;

Derivati della canfora

Derivati a struttura varia (antranilati, fenil-benzimidazosulfonati, ecc.).

Sulla base delle loro caratteristiche chimico-fisiche i filtri agiranno a livello della superficie cutanea fornendo protezione solare attraverso fenomeni di assorbimento, riflessione e diffrazione [12] (Figura 3).

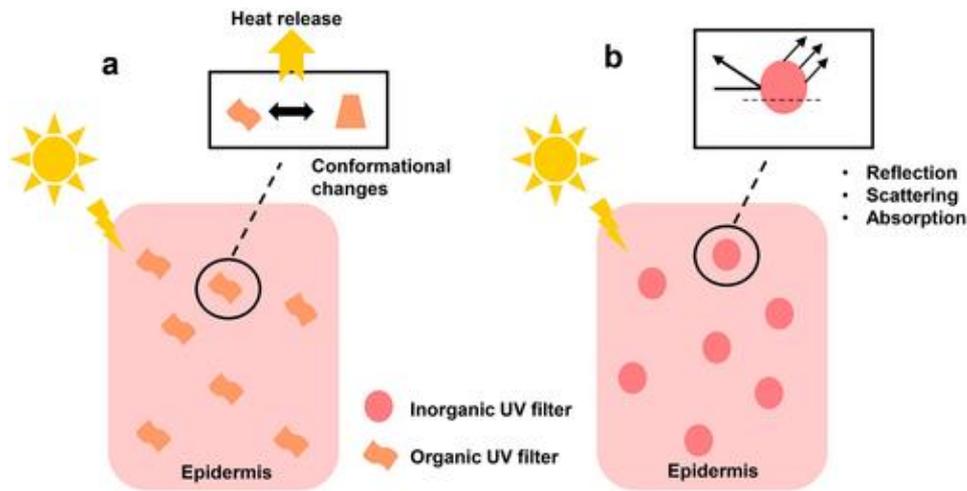


Figura 3 : Modalità d'azione di un filtro organico (a) e di un filtro non organico (b) [1]

I filtri inorganici bloccano la radiazione principalmente per riflessione e dispersione. Ciò non significa che non siano in grado di assorbire i raggi UV, solo non lo fanno in maniera significativa. Per questa ragione sono considerati maggiormente fotostabili rispetto ai filtri organici. Questi sono in grado di assorbire l'energia degli UV subendo di conseguenza modificazioni conformazionali più o meno reversibili e restituendo l'energia sotto diverse forme (vibrazionale, rotazionale, infrarossa).

La capacità filtrante di ogni singolo filtro può essere valutata attraverso il suo Sunscreen Index, o indice di Kumler [14]: un valore che permette di valutare e paragonare l'efficacia dei diversi filtri UV in funzione della misura della loro densità ottica a 308nm a una determinata concentrazione. Il potere filtrante di una formulazione sarà invece valutato con il Sun Protection Factor, SPF, test in vivo su volontari, standardizzato oggi con la ISO 24444.

L'indice esprime il grado di protezione che un prodotto solare può garantire nei confronti degli UVB ed è effettuato sulla cute sana di fototipi chiari valutando la risposta della pelle alla radiazione (MED – minima dose eritematogena) mediante simulatore solare.

FORMULA: $MED\ protetta / MED\ non\ protetta = SPF$

Il 16 aprile 2020 è entrato in vigore lo standard UNI EN ISO 24444:2020 che ha permesso di dettagliare, ottimizzare e rendere più riproducibile la metodica. [15]

Per questo lavoro di tesi sono stati selezionati: Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine.

Nanotecnologie

Le nanoscienze si sono sviluppate fortemente negli ultimi anni e hanno sperimentato un aumento vertiginoso in vari settori.

Ad esempio, troviamo nanomateriali in vari settori come l'agroalimentare, la cosmetica, la medicina (compresi i trattamenti antitumorali e l'imaging diagnostico), il tessile, i componenti elettronici e molto altro.

Il prefisso nano caratterizza lo studio e la manipolazione della materia su scala nanometrica (10^{-9} m).

Infatti, secondo la Commissione Europea 2011/696/UE, CE 2011, il termine "nanomateriale" si riferisce a un "materiale naturalmente formato o fabbricato da particelle o globuli sotto forma di aggregato o sotto forma di agglomerato, di cui almeno il 50% delle particelle, nella distribuzione numerica per dimensione, ha una o più dimensioni esterne comprese tra 1 nm e 100 nm".

L'interesse principale di questa nuova tecnologia del "mondo nano" è la comparsa di proprietà nuove finora non osservate con materiali di dimensioni micrometriche, forma convenzionale utilizzata dalle industrie, in particolare quelle cosmetiche.

Le nanoparticelle sono oggetti con almeno una dimensione inferiore o uguale a 100 nm e le cui proprietà derivano direttamente da questa dimensione.

L'aumento dell'aria superficiale delle nanoparticelle induce un aumento delle reattività biologiche e chimiche. [16]

L'interesse delle forme su scala nanometrica risiede nell'aumento della superficie di contatto a causa delle loro dimensioni più piccole rispetto alle loro controparti di dimensioni convenzionali. Pertanto, le nanoparticelle hanno una migliore reattività grazie a una superficie di interazione più ampia con il loro ambiente.

Hanno anche una migliore biodisponibilità nel trasporto dei principi attivi, e, inoltre, le formulazioni dermocosmetiche su scala nanometrica si stanno rivelando una forma di dosaggio innovativa e molto interessante da sfruttare. [17]

Esistono due tipi di forme su scala nanometrica:

- ✓ **NP organiche** tra cui liposomi, micelle, dendrimeri, nanogel, NP lipidiche, nano-emulsioni e nanotubi di carbonio.

- ✓ **NP inorganiche** composte appunto da sostanze inorganiche.

Nano-emulsioni

Le nano emulsioni sono definite come sospensioni di micelle con una dimensione inferiore a 1 μm che va da 5 a 200 nm.

Sono anche descritte come una dispersione metastabile di micelle nanometriche di un fluido in un altro fluido.

Le proprietà superficiali delle micelle e il diametro delle nano emulsioni svolgono un ruolo preponderante nell'aumento delle zone interfacciali influenzando in particolare le proprietà di trasporto di un farmaco in campo medico e nella formulazione di agenti cosmetici attivi. [18]

Inoltre, hanno la particolarità di creare una distribuzione omogenea sull'epidermide, riducendo l'“effetto lente” per cui, se la crema solare non è ben uniforme sulla pelle, le zone dove ve né di meno si ustioneranno di più.

Come per le emulsioni tradizionali, anche le nano-emulsioni possono essere:

- ✓ **NE in acqua**, in cui le goccioline di olio vengono disperse nella fase acquosa continua
- ✓ **Il NE in olio**, in cui le goccioline d'acqua vengono disperse nella fase oleosa continua. [16]

Le nanoemulsioni presentano una serie di vantaggi, tra cui:

- ✓ **Possibile somministrazione di principi attivi per diverse vie** (orale, topica, parenterale, transdermica ecc.)
- ✓ **Dispensa contemporaneamente farmaci idrofili e lipofili.**
- ✓ **L'aumento della biodisponibilità** dei principi attivi grazie alla dimensione delle micelle all'interno dell'intervallo nanometrico.
- ✓ **La protezione del farmaco contro l'idrolisi e l'ossidazione** a causa della sua incorporazione all'interno di goccioline.
- ✓ **Aumento della penetrazione** del principio attivo attraverso la pelle.

Tuttavia, esiste una serie di svantaggi come:

- ✓ **La necessità di utilizzare una gran quantità di tensioattivi e co-tensioattivi** per promuovere la stabilizzazione.
- ✓ **L'interruzione della stabilità** da temperatura e pH. [19]

Si specifica inoltre che tutte le sostanze cosmetiche impiegati nel territorio Europeo in forma nano-particellare devono essere obbligatoriamente riportati in etichetta con la dicitura “nano” a fianco.

OBIETTIVO DELLA TESI

Da diversi anni si conoscono gli effetti mutageni e cancerogeni delle radiazioni ultraviolette, in particolare UV, aggravati ulteriormente dalla deplezione dello strato stratosferico di ozono.

A causa di questi effetti nocivi e del fenomeno del foto-invecchiamento, causato in particolare dagli UVA, l'utilizzo di filtri solari si è diffuso molto sia nei prodotti solari sia nelle formulazioni per la cura quotidiana di pelle e capelli.

Negli ultimi anni, l'impiego di filtri solari è stato molto discusso a causa del loro impatto ambientale e di potenziali effetti tossici in seguito ad assorbimento locale o sistemico.

Queste considerazioni hanno spinto i ricercatori a sviluppare nuove formulazioni e nuovi sistemi di somministrazione in grado di aumentare la protezione fornita dai prodotti solari già in uso.

In letteratura [20] sono riportati studi che mostrano come una formulazione di tipo nano-particellare possa aumentare la protezione solare per alcuni tipi di filtri, rendendo così possibile la riduzione della quantità di filtro utilizzata per ottenere un determinato SPF.

L'obbiettivo di questa tesi, svolta presso il laboratorio di galenica e cosmetologia dell'Università Aix-Marseille, è il confronto di protezione solare, valutata tramite l'SPF ottenuto in vitro, tra tre emulsioni solari, contenenti diversi filtri solari organici, formulate in modo classico e sottoforma di nanoemulsione.

Per questo lavoro sono stati utilizzati i seguenti filtri: Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine.

PARTE SPERIMENTALE

La figura 4 mostra lo schema effettuato in laboratorio per la preparazione di emulsioni e nanoemulsioni contenenti i filtri solari oggetto dello studio di questa tesi.

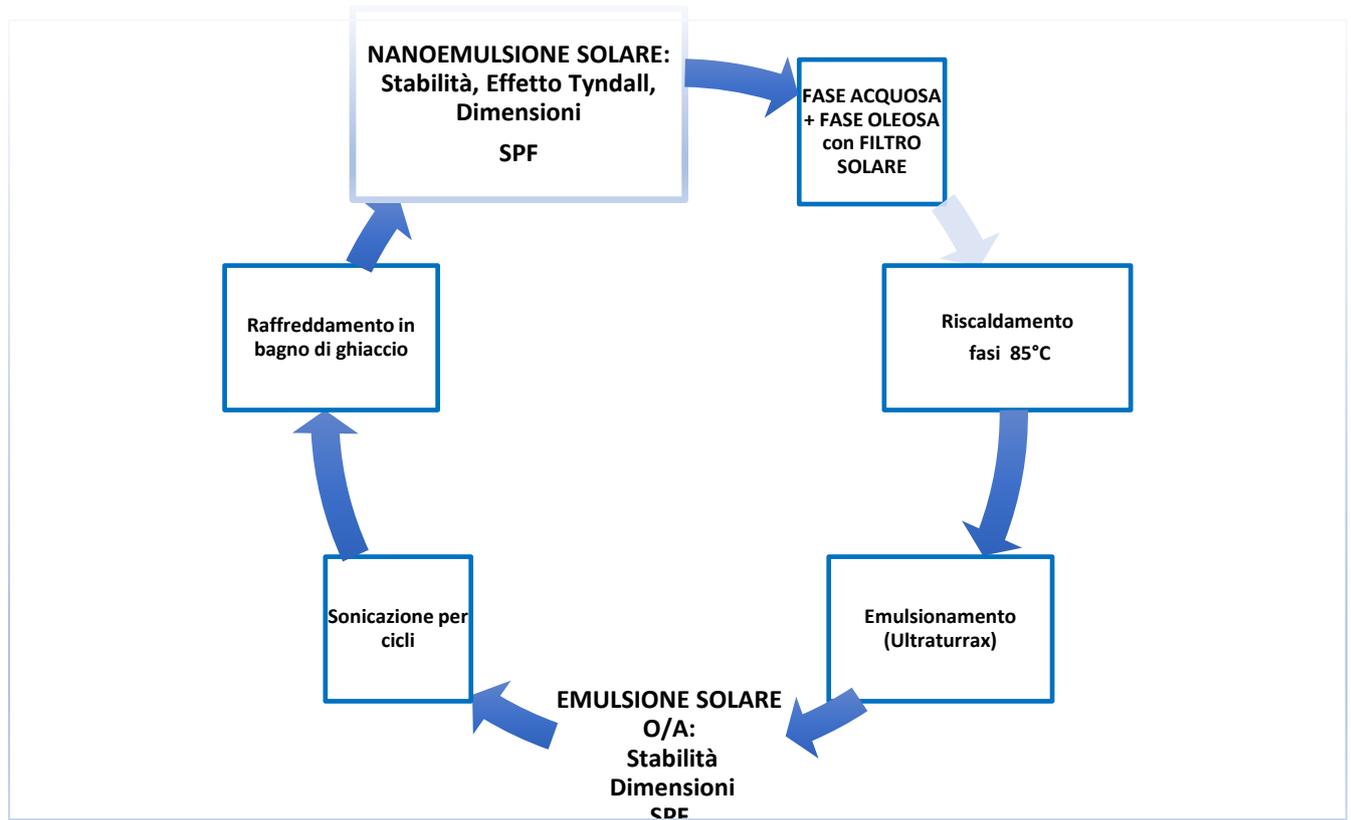


Figura 4: procedura nella preparazione delle diverse formulazioni.

Per poter valutare la maggior efficienza filtrante dei sistemi nanoemulsionati rispetto alle emulsioni classiche attraverso la valutazione dell' SPF in vitro, il lavoro, svolto in Erasmus presso il laboratorio di galenica e cosmetologia del Università Aix-Marseille, ha dovuto seguire diversi step:

- Studio, preparazione e valutazione di emulsioni solari stabili O/A con filtro UV (mediante emulsione con Ultraturrax)
 - o Scelta ingredienti lipofili
 - o Scelta tensioattivi emulsionanti, coemulsionanti
 - o Valutazione dei filtri organici liposolubili

- Condizioni di temperatura
 - Condizioni di emulsione
- Una volta ottenute preparazioni soddisfacenti le emulsioni migliori sono state utilizzate per l'ottenimento delle nanoemulsioni solari mediante sonicazione. [21]
- Le nanoemulsioni sono state valutate in base a:
- Stabilità fisica
 - Effetto Tyndall
 - Dimensioni delle particelle
- L'ottimizzazione delle stesse (in termini di stabilità e performance) viene ottenuta attraverso lo studio di variabili quali
- Condizioni di sonicazione
 - Potenza della sonda
 - numero di cicli di sonicazione
 - Aggiustamento delle formulazioni base in termini di
 - Tipo e percentuale di Ingredienti lipofili
 - Rapporto tra fase oleosa e sistema emulsionante (TA/coTA)
 - Tipo di filtro solare
- Studio in vitro dell'SPF dei nanosistemi in paragone alle emulsioni solari classiche corrispondenti
- Valutazione dei risultati e ottimizzazione mediante aggiunta di gelificante
- Nuovo studio comparativo SPF per valutare eventuali incrementi nell'efficienza

MATERIALI

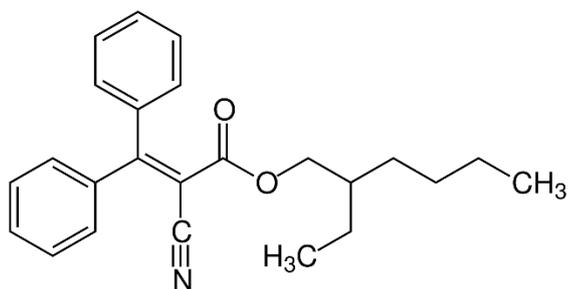
Filtri Solari

Per il nostro progetto sono stati utilizzati quattro molecole appartenenti alla classe dei filtri organici:

Filtro solare	Spettro
BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE	UVA
BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE	UVA e UVB
OCTOCRYLENE	UVB e primi UVA
ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE	UVB

Tabella 1: filtri solari utilizzati e relativi spettri.

Octocrylene



È un estere formato dalla condensazione del 2-etilesil cianoacetato con benzofenone, si presenta come un liquido viscoso, incolore ed insolubile in acqua.

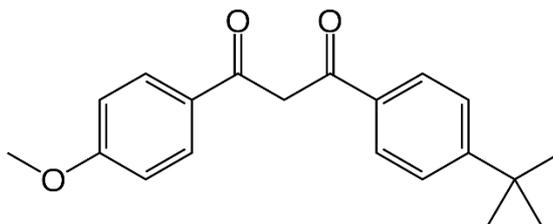
La porzione alchilica ramificata C8 aggiunge al filtro proprietà emollienti e di resistenza all'acqua. L'octocrilene è un filtro solare organico tipicamente utilizzato in combinazione con altri filtri UV per ottenere valori più elevati di fattore di protezione solare.

Ha un ampio spettro di assorbimento che copre i raggi UVB (280-320 nm) e una parte della gamma UVA, chiamata short UVA o UVA II (320-340 nm).

Viene facilmente assorbito attraverso la pelle e alcuni studi hanno dimostrato che promuove la formazione di radicali liberi potenzialmente dannosi.

È attualmente utilizzato in molti prodotti di protezione solare dal momento che, se utilizzato nelle dosi raccomandate (minori del 10%), è generalmente considerato sicuro per l'uomo. [22,23]

Butyl methoxydibenzoylmethane (AVOBENZONE)



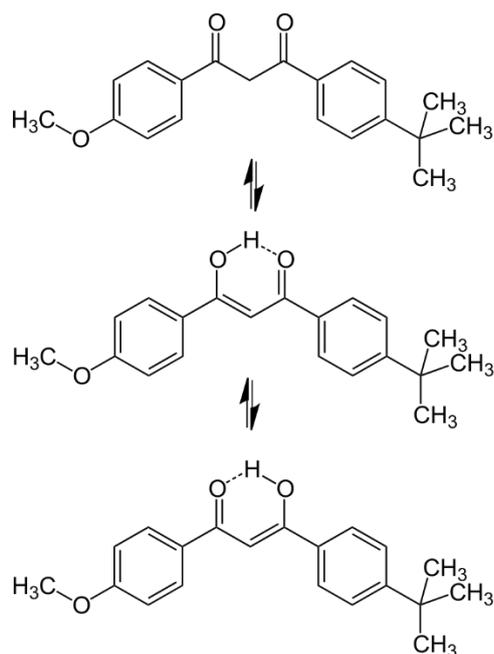
Derivato del dibenzoilmetano, si presenta come una cera leggermente gialla ed è uno dei filtri UVA più comunemente utilizzati nei prodotti solari grazie al suo ampio spettro di assorbimento UV.

Nonostante il suo ampio utilizzo, è da considerarsi un filtro fotoinstabile: sottoposto a radiazione solare la struttura si degrada a causa dell'assorbimento delle radiazioni UV, di conseguenza la protezione solare che fornisce va a ridursi proporzionalmente al tempo di esposizione alle radiazioni.

l'avobenzene è infatti soggetto a tautomeria cheto-enolica, esiste nel suo stato fondamentale come miscela di forme enoliche e di forme chetoniche.

La prima è stabilizzata dal legame idrogeno intramolecolare all'interno del β -dichetone ed è dunque la favorita e prevalente. [24]

In seguito alla radiazione UV, può convertirsi in modo transitorio in forma chetonica, ma si riconverte in forma di enolo dopo il posizionamento al buio.

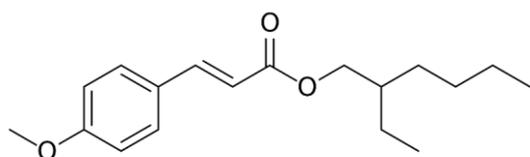


Diverse sono state le strategie ricercate per stabilizzare al meglio questo filtro solare.

Tra queste, l'associazione con altri filtri solari, tra cui l'octylmethoxycinnamate, è risultata la favorita.

L'avobenzone, essendo un enolato, forma con ioni di metalli pesanti (come Fe^{3+}) complessi colorati, mentre con stearati, sali di alluminio, magnesio e zinco si possono verificare precipitati scarsamente solubili. [25] La quantità d'impiego consentita dalla legge è il 5%.

Ethylhexyl methoxycinnamate (PARSOL MCX)



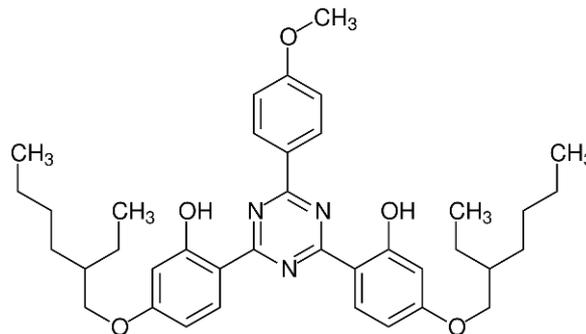
È un estere formato da acido metossicinnamico e il 2-etilesanolo, si presenta come un liquido trasparente insolubile in acqua e presenta assorbimento nello spettro UVB.

Strutturalmente presenta gruppi cromofori, come $\text{C} = \text{C}$ e $\text{C} = \text{O}$, che hanno elettroni liberamente trattenuti: questi possono essere eccitati dalla radiazione.

Quindi, l'ottile metossicinnamato è in grado di assorbire la radiazione quando il livello di energia dell'elettrone viene aumentato a uno stato eccitato. [26]

Molto spesso viene combinato con altri filtri al fine di ottenere un valore migliore di SPF e migliorarne la stabilità. La quantità di impiego consentita dalla legge è il 10%.

Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (TINOSORB S)



Si presenta come una polvere di colore giallo con odore caratteristico, solubile in oli cosmetici polari e insolubile in acqua.

È un filtro ad ampio spettro, poiché fornisce protezione sia nei confronti delle radiazioni UVB sia di quella UVA corte e lunghe.

Presenta infatti due picchi massimi di assorbimento, uno a 310 nm (regione degli UVB) e l'altro a 340 nm (regione degli UVA). [27]

È una molecola filtrante fotostabile e non viene assorbita dalla cute, molto efficace tra i filtri solari ad ampio spettro di nuova generazione; è in grado di contribuire in modo significativo all'aumento dell'SPF nelle formulazioni in cui viene inserito.

Può essere impiegato, oltre che per le sue capacità filtranti, anche per stabilizzare eventuali filtri solari non fotostabili. Alcuni studi hanno dimostrato che non possiede effetti estrogenici in colture cellulari e raramente causa allergie e irritazioni. [28]

È un filtro solare fotostabile e liposolubile di recente produzione e dal 2000 è stato approvato sia in Europa (quindi inserito nell'allegato VI del Regolamento 1223/09) sia in Australia. [29]

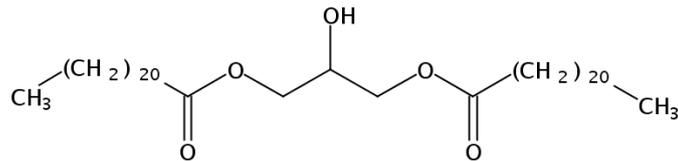
Inoltre, a differenza di molti altri filtri solari non ha manifestato effetti estrogenici in vitro. [24]

La quantità d'impiego massima consentita dalla legge è il 10%.

Sostanze Lipofile

Durante i nostri studi sono state testate diverse combinazioni di cere ed esteri il composto di elezione è risultato il Glyceryl Dibehenate.

Glyceryl Dibehenate (Compritol 888)



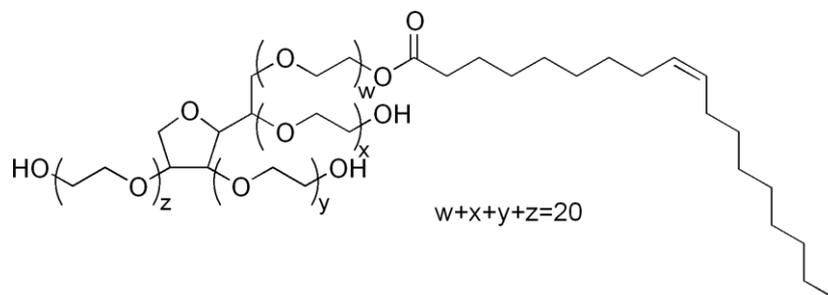
È un digliceride lipofilo ad alto punto di fusione, dato dall'esterificazione di una molecola di glicerina con due molecole di acido beenico (o acido docosanoico C22), comunemente usato nelle applicazioni farmaceutiche come lubrificante per capsule, eccipiente orale o matrice per preparazioni a rilascio prolungato.

In cosmetica è utilizzato come emolliente in mascara, creme solari ed emulsioni per il viso.

Si può presentare sotto forma di cristalli o di polvere bianca. [30]

Tensioattivi Emulsionanti

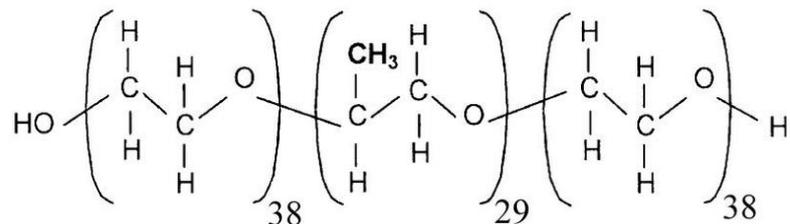
Polysorbate 80 - POE (20)- sorbitan monooleate



Composto derivato dall' esterificazione del sorbitolo e acido oleico, è un tensioattivo non ionico etossilato ampiamente utilizzato per stabilizzare sospensioni ed emulsioni.

Tween 80 presenta un HBL di 15 ed è un ottimo agente bagnante e solubilizzante in preparati semi-solidi o liquidi come creme o lozioni. È anche usato come additivo nella formulazione di compresse. Questo composto è spesso utilizzato anche come co-tensioattivo. [31]

Poloxamer 188 (Lutrol® F68)



I poloxameri sono copolimeri tri-blocchi non ionici composti da una catena idrofobica centrale di polioisopropilene legata da due catene idrofile di polioisossietilene.

Una caratteristica importante delle soluzioni di poloxamero è la dipendenza del comportamento reologico dalla temperatura: le soluzioni acquose concentrate di poloxameri sono liquide a bassa temperatura e formano un gel a temperatura più elevata in un processo reversibile.

Le transizioni che avvengono in questi sistemi dipendono dalla composizione del polimero (peso molecolare e rapporto molare porzione idrofila/idrofoba).

Il Lutrol F68, grazie alle sue caratteristiche anfipatiche, è considerato un tensioattivo ed è ampiamente utilizzato nella formulazione di sistemi dispersi complessi, come nanoemulsioni e liposomi. È stato scelto sia per le sue proprietà emulsionanti sia per quelle stabilizzanti. [32]

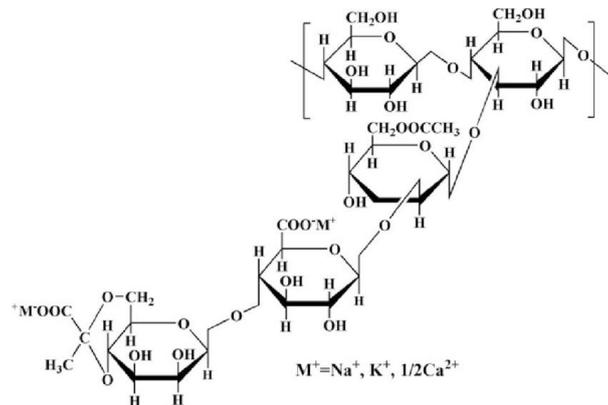
Gelificanti

I gelificanti sono modificatori reologici comunemente utilizzati nei sistemi dispersi per ridurre la differenza di densità presente tra fasi interne fase esterna.

Infatti, proprio la differenza di densità tra le fasi di un'emulsione è uno dei principali motivi alla base dei fenomeni di flocculazione, creaming e coalescenza.

Inoltre, la presenza o l'assenza di un gelificante all'interno di una crema solare può influenzare l'attività del filtro solare, variandone l'SPF.

Xanthan Gum_(Gomma xantana)



È un gelificante di origine naturale ottenuto dalla fermentazione degli zuccheri del batterio "*Xanthomonas campestris*".

Viene commercializzato sotto forma di polvere granulata di colore bianco facilmente disperdibile e si trova molto ampiamente usata in campo cosmetico, farmaceutico e alimentare.

Impiegata a bassi dosaggi (0.2-0.5%), la gomma xantana viene utilizzata in particolare per aumentare la stabilità delle emulsioni. [33]

METODI

Preparazione Emulsioni

Per ottenere una nanoemulsione stabile è stato prima necessario mettere a punto la formulazione di un'emulsione classica e in seguito sottoporla a sonicazione, per ridurre il diametro delle particelle.

Il protocollo seguito per ottenere l'emulsione di partenza è stato:

1. Pesare, in due beker separati, i componenti lipofili (filtri solari compresi) e i componenti idrofili (acqua e tensioattivi).
2. Schermare il beker contenente la fase grassa con la stagnola, in modo che i filtri non vengano esposti alla luce prematuramente.
3. Porre la fase grassa su piastra agitante riscaldante ed inserire l'ancora magnetica e il termometro per rilevare la temperatura.

4. Parallelamente porre la fase acquosa su un'altra piastra
5. Quando entrambe le fasi hanno raggiunto i 85 °C, inserire l'omogenizzatore nella fase grassa e mantenendo in agitazione il preparato, integrarvi la fase acquosa.
6. Mantenere l'omogenizzatore in funzione per 6 minuti ad una velocità di 12500 rpm.
7. Al termine dei 6 minuti, scalare la velocità fino a 0 e prelevare l'emulsione ottenuta.

Preparazione Nanoemulsioni: Sonicazione

Il dispositivo utilizzato è il Sonifier® del marchio BRANSON (figura 5) e il processo è il seguente:

1. Accendere il dispositivo e posizionare la formulazione all'interno della camera di sonicazione.
2. Inserire la sonda all'interno del becher al centro, in modo che risulti equidistante da tutti i lati del recipiente.
3. Chiudere la camera e avviare la sonda in modalità PULSE a 650 Watt per un ciclo della durata di 1 minuto composto da 50 secondi di sonicazione e 10 secondi di riposo.
4. Ripetere il punto 3 per un totale di 5 cicli.
5. Dopo i 5 cicli di sonicazione raffreddare l'emulsione in un bagno maria ghiacciato.

Al termine si dovrebbe ottenere un'emulsione stabile che, a seconda della grandezza delle micelle, può presentare effetto Tyndall. [21]



Figura 5: effetto Tyndall ottenuto in seguito a sonicazione con Sonifier® del marchio BRANSON.

Caratterizzazione delle Emulsioni e Nanoemulsioni

DLS "Dynamic Light Scattering"

L'apparecchiatura utilizzata è uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Regno Unito) (figura 6), che consente il rilevamento di aggregati e la misurazione di campioni più o meno concentrati. Permette inoltre di misurare il PDI (Polydispersity Index) che rappresenta la dispersione di una popolazione di particelle in un campione colloidale il valore ottimale deve essere compreso tra 0 e 0.3.



Figura 6: Foto dello strumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Regno Unito).

Il procedimento della misurazione consiste dei seguenti passaggi:

1. Risciacquare una cuvetta in polistirene (10 x 10 x 45 mm) con acqua distillata.
2. Prelevare 1 mL del campione da analizzare utilizzando una pipetta
3. Posizionare 1 mL nella cuvetta di plastica avendo cura di evitare la formazione di bolle d'aria e di non lasciare tracce sulle pareti.
4. Posizionare la cuvetta all'interno del Nanosizer.
5. Selezionare i seguenti parametri sul software Zetasizer:
tipo di misura (Dimensioni), materiale (polistirene lattice), fase di dispersione (acqua distillata), temperatura (25°C), tipo di cuvetta utilizzata (DTS0012), angolo di misura (90°).

6. Lo strumento registra tre misurazioni sullo stesso campione e calcola un valore medio.

Misurazione SPF in Vitro

Lo strumento utilizzato è uno spettrofotometro, effettuando misurazioni in trasmittanza e applicazione di un metodo computazionale per calcolare l' SPF.

Il procedimento per la misurazione prevede l' utilizzo di piastre in polimetilmetacrilato (PMMA) della dimensione di 50X50 mm per un' area superficiale di 2,5 cm quadri.

Queste presentano due facce: una liscia attraverso la quale passerà il fascio di luce e una faccia ruvida che imita la rugosità della pelle e su cui verrà distribuito il campione. [34]

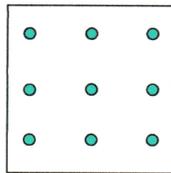
Per eseguire una valutazione del SPF, le piastre sono prelevate dallo spettrofotometro ed inserite nel Sun test dove sono sottoposte ad un irraggiamento simile a quello solare durante le ore più calde (550 W/m). Dopo questo trattamento si è andato a rimisurare l' SPF per valutare la fotostabilità dell' emulsione.

Il protocollo da seguire è il seguente:

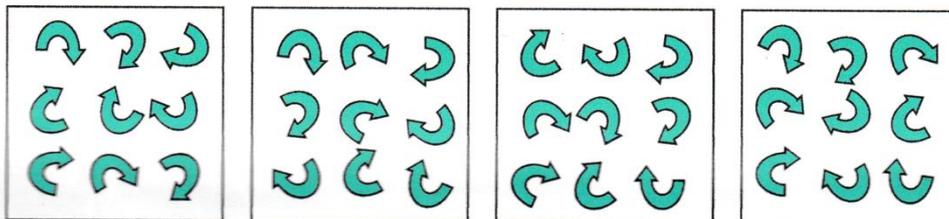
1. Accendere lo spettrofotometro ed inserire una piastra pulita all'interno per ottenere il bianco:

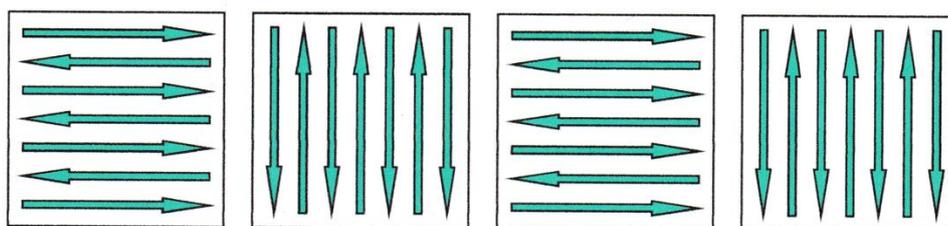
impostando il software in modo che esegua una scansione tra 290 e 300 nm di lunghezza d' onda, che corrisponde allo spettro UV, e che effettui una misurazione ogni 1 nm.

2. Preparare una prima piastra disponendo l' emulsione in 9 depositi uguali.



3. Stendere il prodotto con il dito sul piatto, secondo il seguente metodo di diffusione:





4. Dopo la diffusione, controllare che la massa del prodotto rimanente sia di circa 15 mg, in modo da avere 6 mg per cm³. [35]
5. Attendere 15 minuti e quindi inserire la piastra nello spettrofotometro. Il software calcola l'assorbanza per la prima volta.
6. Una volta che lo spettro è stato scansionato, ruotare la piastra di 90 gradi e riprendere la misurazione.
7. Ripetere un'ulteriore volta la misurazione ruotando ancora la piastra, in modo da ottenere 3 misurazioni per ogni piastra.
8. Ripetere nuovamente il protocollo per altre 2 piastre.

Per testare ogni singola formulazione, sono state utilizzate 3 piastre e per ciascuna lo strumento ha eseguito 3 misure proponendo un valore medio.

In seguito, abbiamo sottoposto le piastre ad una simulazione di esposizione a radiazione solare: la potenza scelta per studiare la fotostabilità dei filtri solari è stata di 550 W/m².

Il dispositivo utilizzato per questo è il Sun test che permette di confrontare l'SPF prima e dopo l'irradiazione e quindi l'impatto della radiazione UV sui filtri solari.

Idealmente l'SPF dovrebbe essere stabile prima e dopo l'irradiazione e quindi, se il filtro o l'associazione di filtri è fotostabile, non si dovrebbero presentare variazioni di SPF significative.

Dopo l'irraggiamento è stata eseguita una scansione con spettrofotometro seguendo lo stesso protocollo precedentemente descritto.

È importante ricordare che per commercializzare un prodotto per la protezione solare, le normative richiedono che la protezione dai raggi UVA sia equivalente a 1/3 della protezione degli UVB.

In fine ricordiamo che i metodi in silico, come il BASF sunscreen simulator, sono stati utilizzati come ausili formulativi con l'obiettivo di prevedere il valore dell'SPF scegliendo una percentuale di filtri solari desiderata. [36]

RISULTATI e DISCUSSIONE

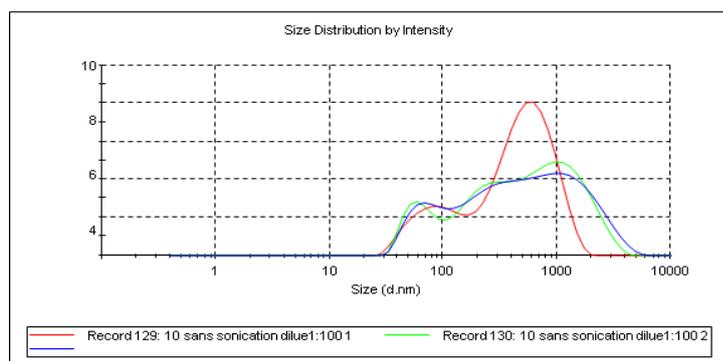
Caratterizzazione emulsioni classiche e nanoemulsioni

Dopo diverse prove sono state individuate tre diverse emulsioni solari O/A fisicamente stabili che sono state caratterizzate per quanto riguarda dimensioni e distribuzione della fase dispersa prima (F1, F2 ed F3 cioè emulsioni classiche) e dopo sonicazione (F1S, F2S, F3S cioè nanoemulsioni), vedi tabelle sottostanti.

Tabella 2: composizione della prima emulsione classica F1.

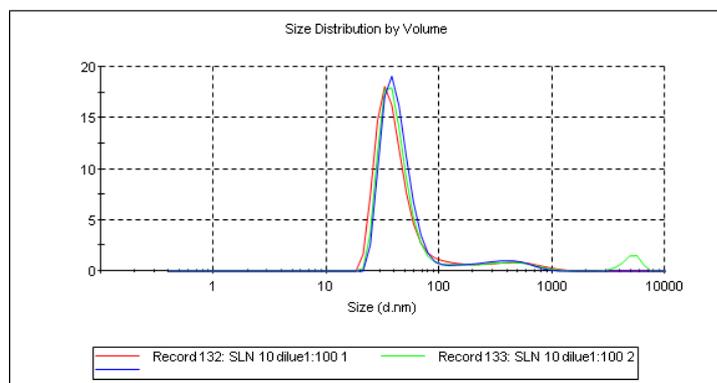
FORMULAZIONE F1	Funzione	Quantità (%)	Filtro solare (%)	% Fasi
POLYSORBATE 80 (Tween 80)	Tensioattivo	3,33%		5%
POLOXAMER 188 (Lutrol F68)	Tensioattivo	1,67%		
GLYCERYL DIBEHENATE (Compritol 888)	Sostanza Lipofila	3%		10%
BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (Avobenzone)	Filtro UV	2%	7%	
Octocrylene	Filtro UV	5%		
AQUA		85%		85%

F1 prima della sonicazione (emulsione classica)



Size (nm)	Intensity (%)	St Dev
916,1	82,3	855,9
70,54	17,7	20,95

F1 sonicata F1S (nanoemulsione)

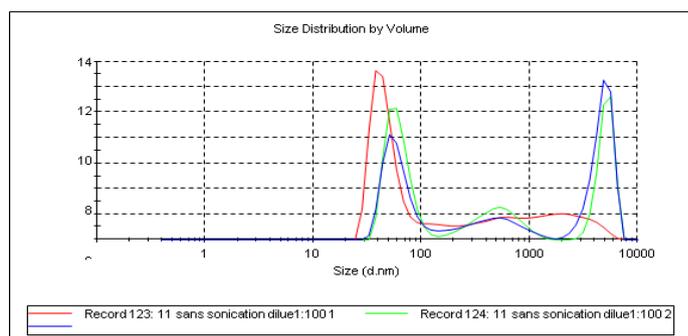


Size (nm)	Intensity(%)	St Dev
506,4	7,7	248,7
44,84	92,3	28,90

Tabella 3: composizione della seconda emulsione classica F2

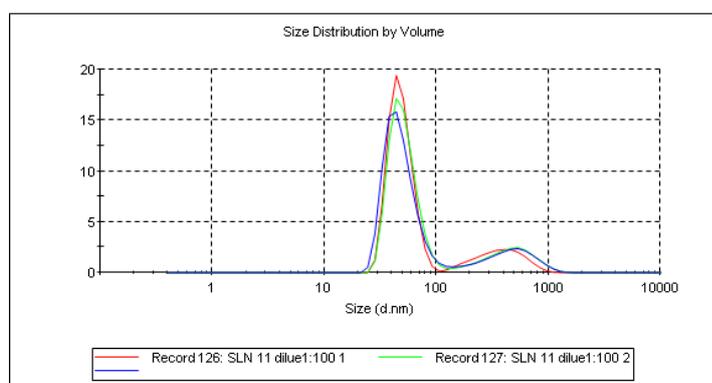
FORMULAZIONE F2	Funzione	Quantità (%)	% Filtro solare	% Fasi
POLYSORBATE 80 (Tween 80)	Tensioattivo	3,33%		5%
POLOXAMER 188 (Lutrol F68)	Tensioattivo	1,67%		
GLYCERYL DIBEHENATE (Compritol 888)	Sostanza Lipofila	3%		10%
BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (Avobenzone)	Filtro UV	2%	7%	
OCTOCRYLENE	Filtro UV	3%		
OCTYLMETHOXYCINNAMATE	Filtro UV			
AQUA		85%		85%

F2 prima della sonicazione (emulsione classica)



Size (nm)	Intensity %	St Dev
55,08	62,1	32,14
472,9	15,4	199,1
2261	22,5	1235

F2 sonicata F2S (nanoemulsione)

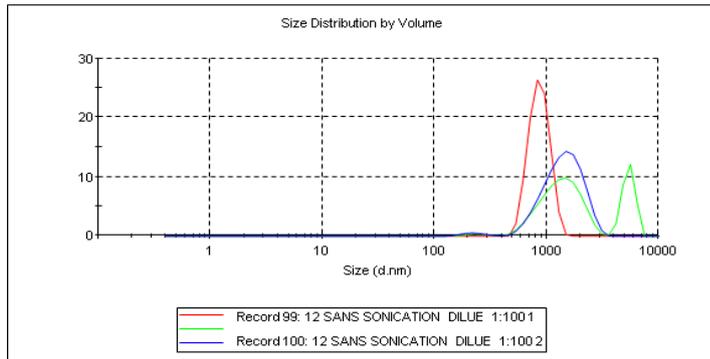


Size (nm)	Intensity%	St Dev
483,7	20,1	230,9
49,21	79,9	18,30

Tabella 4: composizione della terza emulsione classica F3

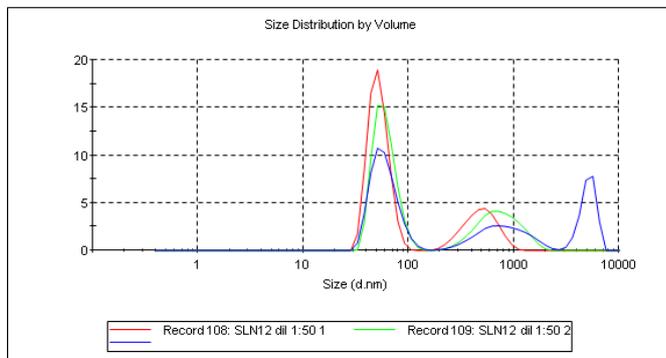
FORMULAZIONE F3	Funzione	Quantità (%)	% Filtro solare	% Fasi
POLYSORBATE 80 (Tween 80)	Tensioattivo	3,33%		5%
POLOXAMER 188 (Lutrol F68)	Tensioattivo	1,67%		
GLYCERYL DIBEHENATE (Compritol 888)	Sostanza Lipofila	3%		10%
BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (Tinosorb S)	Filtro UV	7%	7%	
AQUA		85%		85%

F3 prima della sonicazione (emulsione classica)



Size (nm)	Intensity%	St Dev
1480	97,8	540,0
228,0	2,2	52,35

F3 sonicata F3S (nanoemulsione)



Size (nm)	Intensity%	St Dev
499,5	28,1	174,4
52,42	71,9	11,64

Per tutte le formulazioni si può osservare come il processo di sonicazione non riduca solo i diametri delle micelle rendendole nanoparticellari ma anche migliori la deviazione standard del campione; infatti, i picchi delle 3 misurazioni sonicate risultano più sovrapposti e predomina una popolazione dimensionale rispetto alle altre.

Fotoprotezione UV e SPF

Si è passati quindi alla valutazione comparativa delle emulsioni classiche rispetto alle nanoemulsioni per quanto riguarda la fotoprotezione UV ed i risultati ottenuti sono mostrati in tabella 4.

Tabella 5: valutazione comparativa emulsione solare classica e nanoemulsione.

Formulazione	PROTEZIONE UV	PROTEZIONE UV
	Pre irraggiamento	Dopo irraggiamento
F1	SPF: 7.74 UVA: 7.74	SPF: 7.64 UVA: 7.40
F1S	SPF: 10.30 UVA: 10,46	SPF: 8,77 UVA: 8,67
F2	SPF: 12,89 UVA: 9,13	SPF: 8,49 UVA: 5,58
F2S	SPF: 12,46 UVA: 8,95	SPF: 9,53 UVA: 6,36
F3	SPF: 3,64 UVA: 3.47	SPF: 3,56 UVA: 3,38
F3S	SPF: 9,77 UVA: 9,13	SPF:3,80 UVA: 3,75

Prendendo in considerazione i valori ottenuti nella tabella osserviamo che:

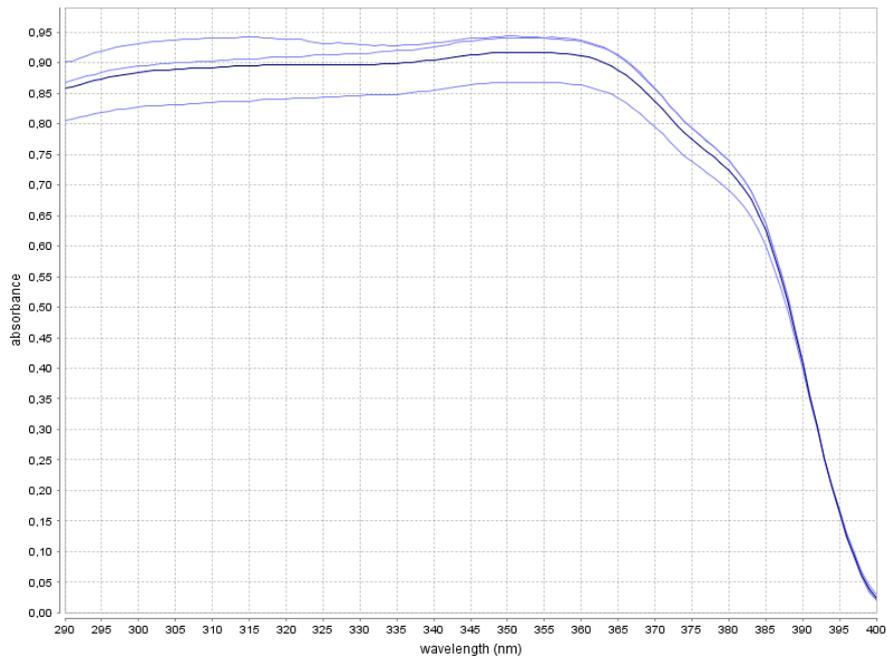
Per **F1/F1S**:

l'SPF è stabile prima e dopo l'irradiazione, presentando quindi una buona fotostabilità.

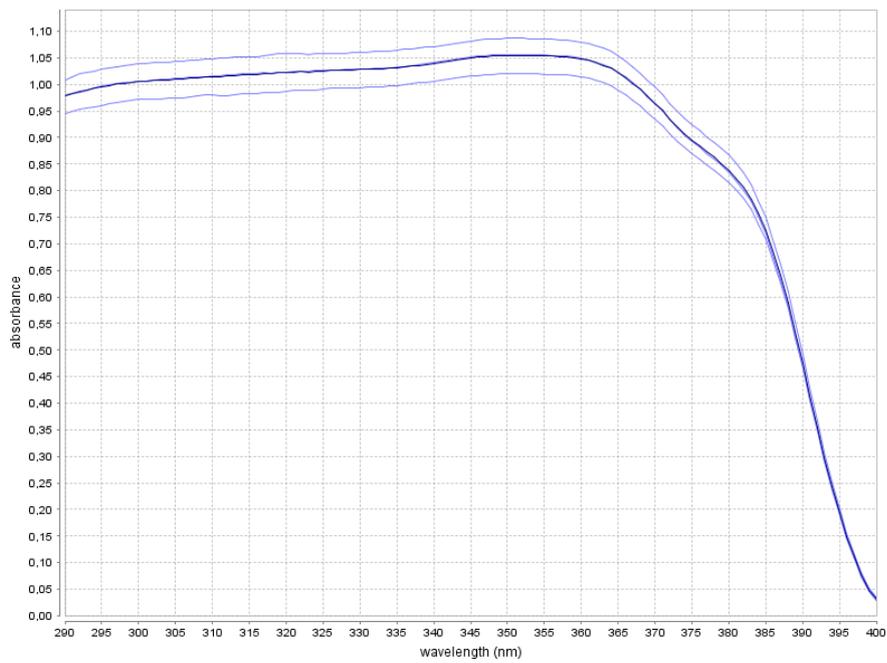
Per F1S si può notare innanzitutto un aumento del SPF che passa da 7,74 nella F1 a 10,30 e poi un aumento ulteriore a 13,65 in seguito a gelificazione (vedi tabella 5). Immagine 6

Per contro, F1S risulta più fotoinstabile rispetto alla tradizionale, fattore che però viene fortemente attutito dall'aggiunta del gelificante (vedi tabella 5).

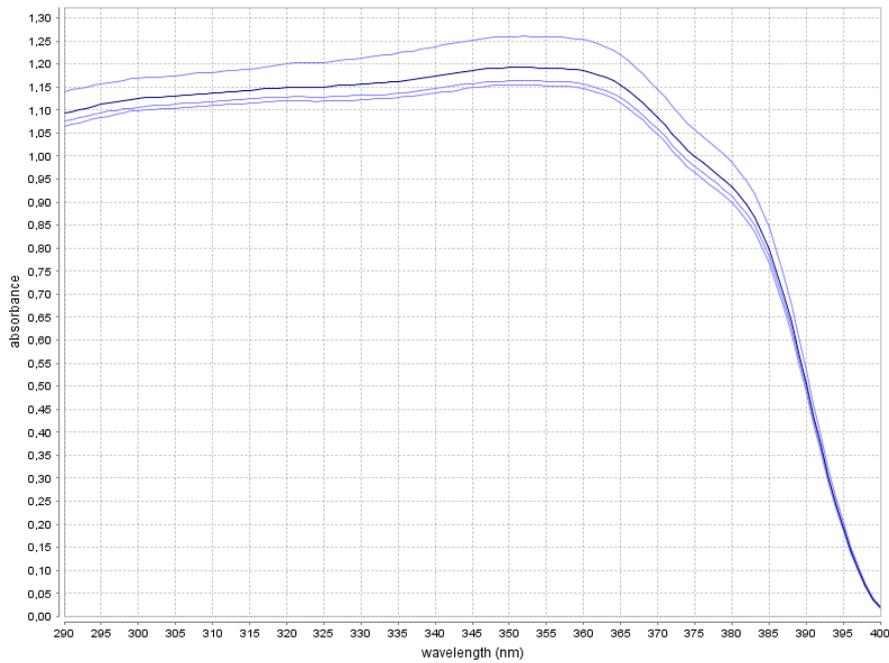
In tutti e quattro i casi l'andamento dello spettro UVA ha seguito quello del SPF.



(1)



(2)

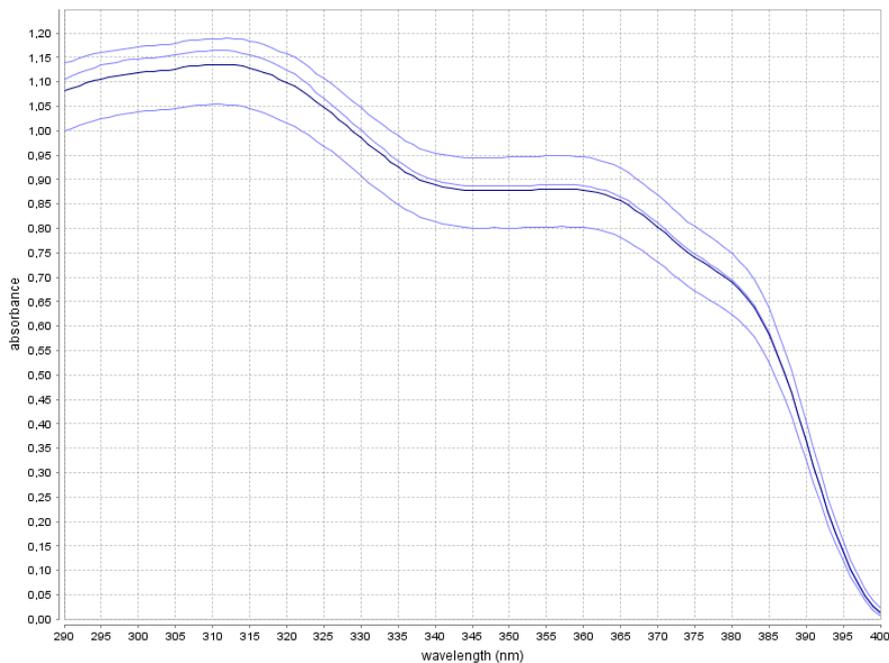


(3)

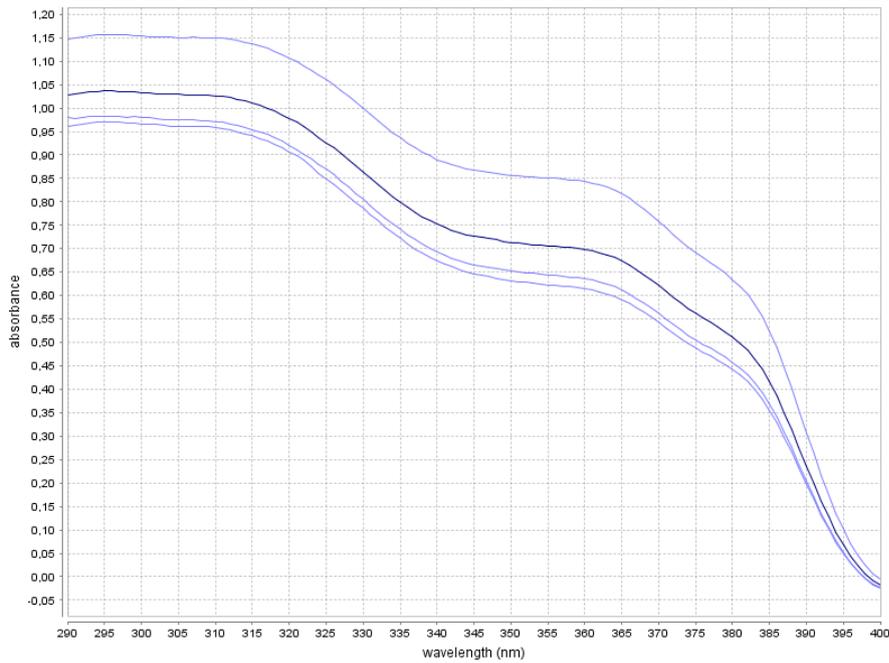
Figura 6: grafici rappresentanti lo spettro UV relativo al SPF della formulazione 1 classica (1), sonicata (2), sonicata e gelificata (3)

Per **F2/F2S:**

Entrambe presentano una fotostabilità superiore a quella della F1/F1S, anche dopo gelificazione. (vedi tabella 5). Risulta essere la formulazione migliore anche per gli UVA.



(1)

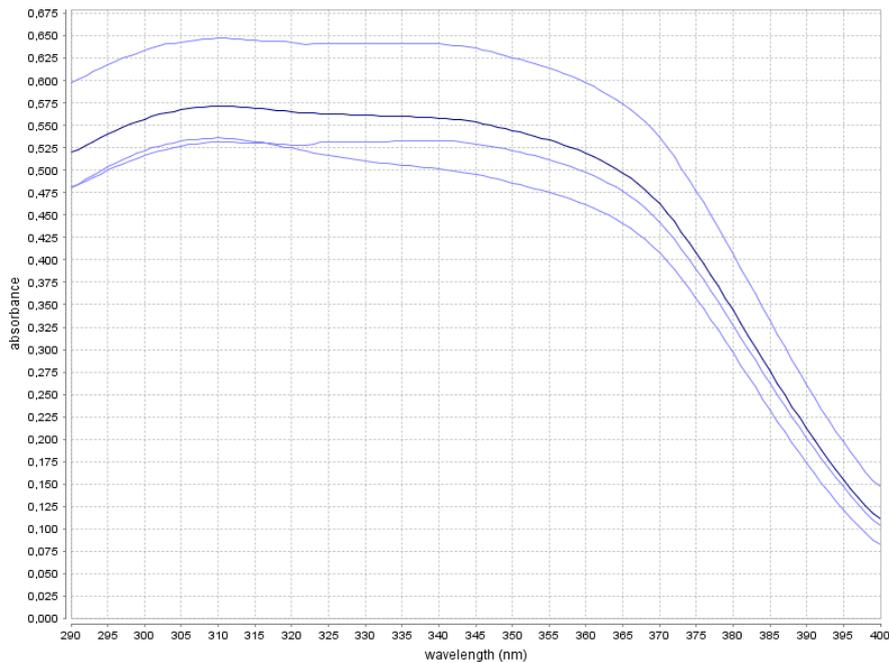


(2)

Figura 7: grafici rappresentanti lo spettro UV relativo al SPF della formulazione 2 sonicata e gelificata prima dell'irradiazione (1) e dopo l'irradiazione (2).

Per **F3/F3S**:

Tenendo conto che si è usata la stessa percentuale di filtro solare in tutte e tre le formulazioni, il 7%, quest'ultima è sicuramente la formulazione che ha mostrato SPF più basso.



(1)

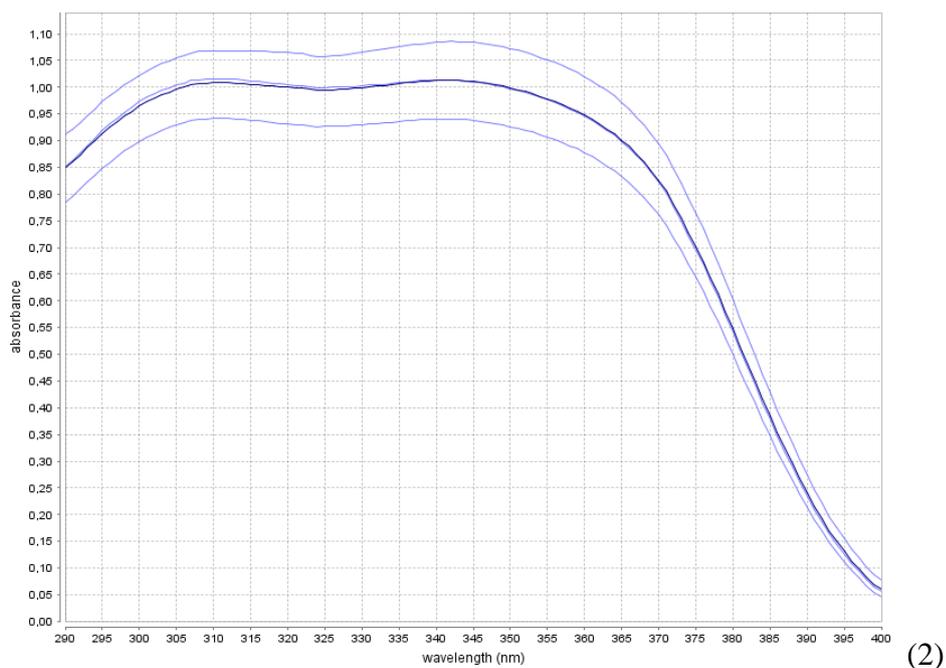


Immagine 8: grafici rappresentanti lo spettro UV relativo al SPF della formulazione 3 classica (1) e sonicata (2).

Di seguito viene riportata la tabella relativa all'aggiunta di gomma xantana ad ogni precedente formulazione per aumentare il grado di gelificazione e quindi aumentarne la stabilità.

Tabella 6: valutazione comparativa emulsioni e nanoemulsioni con gomma xantana.

Formulazioni	PROTEZIONE UV	
	Pre irraggiamento	Dopo irraggiamento
F1G	SPF: 8.2 UVA: 8.71	SPF: 7.63 UVA: 7.53
F1SG	SPF: 13,65 UVA: 13,97	SPF: 13,77 UVA: 13,71
F2G	SPF: 17,66 UVA: 12,14	SPF: 11,08 UVA: 7.17
F2SG	SPF: 23,70 UVA: 16,55	SPF: 14,31 UVA: 9,29
F3G	SPF: 3,82 UVA: 3,70	SPF: 2,86 UVA: 2,81
F3SG	SPF: 9,47 UVA: 9,17	SPF: 4,29 UVA: 4,31

Come si può notare dai risultati ottenuti la gelificazione non sembrerebbe avere un ruolo fondamentale sulle formulazioni studiate.

All'inizio di questo progetto, ci si attendeva che la formulazione in nanoemulsione unitamente alla gelificazione potesse migliorare l'SPF di tutte le formulazioni analizzate.

Tuttavia, i risultati ottenuti non hanno mostrato un andamento regolare e applicabile a ogni filtro solare (o combinazione di essi), ma bensì una serie diversa di risposte caratterizzate da diversi andamenti dei tre parametri principali presi in considerazione: la foto stabilità, l'SPF e l'effetto della gelificazione sulle emulsioni.

CONCLUSIONI

L'oggetto di studio di questo lavoro è stato quindi focalizzato sullo sviluppo di forme innovative su scala nanometrica nel campo della cosmetica, più precisamente nell'ambito del solare.

L'obiettivo era quello di confrontare l'impatto che una nanoemulsione poteva avere sull' SPF di 3 diverse emulsioni solari, e come questo sarebbe cambiato in seguito a gelificazione.

Dallo studio è emerso che a seconda della natura del filtro e della presenza o assenza di gelificante in formulazione, l' SPF non variava in maniera significativa.

La formulazione 1, contenente avobenzone e octocrylene, ha avuto la risposta più vicina alle nostre aspettative: l' SPF è aumentato sia in seguito a gelificazione della formulazione tradizionale, sia quando sottoposta a sonicazione e infine ha avuto un aumento significativo quando si sono combinate entrambe le tecniche. Inoltre, l'emulsione risulta avere una buona fotostabilità.

La formulazione 2, contenente avobenzone, octocrylene e Octylmethoxycinnamate, ha risposto bene alla gelificazione, l' SPF è aumentato sia per le emulsioni tradizionali che sonicate ed ha presentato la fotoinstabilità più marcata tra le tre formulazioni.

La formulazione 3, contenente Tinosorb S, è fotostabile nelle forme tradizionali mentre le forme sonicate sono fotoinstabili. L' SPF dell'emulsione aumenta significativamente in seguito a sonicazione, ma non in seguito a gelificazione.

Una prospettiva interessante potrebbe essere l'inserimento di antiossidanti in formulazione al fine di ridurre la fotoinstabilità di alcune emulsioni.

Inoltre, nello studio è stato utilizzato lo stesso schema formulativo per tutte e tre le emulsioni al fine di ottenere un confronto più pertinente.

Tuttavia, data la diversa natura chimica dei filtri utilizzati, lo stesso schema formulativo, per quanto applicabile ai filtri impiegati, potrebbe non essere il migliore nei diversi casi specifici.

Lo studio delle forme su scala nanometrica è in piena espansione considerando il rapido sviluppo delle nanotecnologie e delle conseguenze spesso gravi causate dalle radiazioni UV che colpiscono l'intera popolazione.

Il campo della "Nanocosmesi" è certamente in pieno sviluppo ma l'uso di questi nanomateriali potrebbe presentare nuovi rischi tossicologici inaspettati per la salute. Il lavoro di questa tesi sta continuando nello studio di nanoparticelle solide lipidiche (SLN) come carrier di filtri solari ma dovranno essere indagati maggiormente i rischi potenziali e tossicologici legati a questa scienza innovativa e promettente.

BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA

- 1) Egambaram, OP; Pillai, SK and Ray, SS, Materials Science Challenges in Skin UV Protection: A Review, Photochemistry And Photobiology 96 (4), pp.779-797, Jul 2020
- 2) <https://www.dermatologianapoli.wordpress.com/about/fotoprotezione>
- 3) Dahabra, L.; Broadberry, G.; Le Gresley, A.; Najlah, M.; Khoder, M. Sunscreens Containing Cyclodextrin Inclusion Complexes for Enhanced Efficiency: A Strategy for Skin Cancer Prevention, Molecules, 26, pp. 1698, 2021
- 4) Jung, K.; Seifert, M., The Role of Antioxidants in Cosmetic Products to Prevent Free Radical Damage in Skin-an Efficacy Study., EURO COSMETICS, 15, 16, 2007
- 5) <https://www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:265:0039:0043:it:PDF>
- 6) Moynihan, Humphrey, Crean, Abina, Physicochemical Basis of Pharmaceuticals, OUP Oxford, Jul 2009
- 7) Defraeye, T.; Bahrami, F.; Ding, L.; Malini, R.I.; Terrier, A.; Rossi, R.M., Predicting Transdermal Fentanyl Delivery Using Mechanistic Simulations for Tailored Therapy., Front. Pharmacol., 11., 2020
- 8) Jullian, C.; Moyano, L.; Yañez, C.; Olea-Azar, C., Complexation of Quercetin with Three Kinds of Cyclodextrins: An Antioxidant Study., Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 67, pp.230–234, 2007
- 9) Types|Skin Cancer|Cancer Research UK. Available online: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/skin-cancer/types> (accessed on 17 February 2021)
- 10) Kayaci, F.; Uyar, T., Encapsulation of Vanillin/Cyclodextrin Inclusion Complex in Electrospun Polyvinyl Alcohol (PVA) Nanoweb: Prolonged Shelf-Life and High Temperature Stability of Vanillin, Food Chem., 133, pp.641–649., 2012
- 11) Pyo, S.M.; Maibach, H.I., Skin Metabolism: Relevance of Skin Enzymes for Rational Drug Design., Ski. Pharm. Physiol., 32, pp.283-294, 2019
- 12) Morabito, K.; Shapley, N.C.; Steeley, K.G.; Tripathi, A., Review of Sunscreen and the Emergence of Non-conventional Absorbers and Their Applications in Ultraviolet Protection., Int. J. Cosmet. Sci., 33, pp. 385–390, 2011
- 13) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/HTML/?uri=CELEX:02009R1223-20211001&qid=1643795353372&from=EN#tocId77>

- 14) Kumler, W.D., Relative Action of Sunscreen Compounds, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 41, Issue 9, pp. 492-493, 1952
- 15) Regola, E., Aggiornamento dello Standard ISO 24444:2020 Per la determinazione in vivo del fattore di protezione solare., CEC editore, *Cosmetic Technology*, 6, 2020
- 16) Rigano, L. and Lionetti, N., Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*, 121–148, 2016
- 17) Siafaka, P.I.; Okur, N. Ü.; Karavas, E; Bikiaris, D.N., *Surface Modified Multifunctional and Stimuli Responsive Nanoparticles for Drug Targeting: Current Status and Uses*, 2016
- 18) Mason, T.G.; Wilking, J.N.; Meleson, K.; Chang, C.B.; Graves, S.M., Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties, *Journal of Physics: Condensed Matter*, Volume 18, 41, 2006
- 19) Kesrevani, R.K.; and Sharma, A.K., *Nanoarchitected Biomaterials: Present Status and Future Prospects in Drug Delivery.*, *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*, 2016
- 20) Nikolic´, S.; Keck, C.M.; Anselmi, C.; Müller, R.H., Skin photoprotection improvement: Synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters *International Journal of Pharmaceutics*, 414, pp 276-284, 2011.
- 21) Hosseinzadeh, S., Baharifar, H., & Amani, A., EFFICACY OF A MODEL NANO-TIO2 SUNSCREEN PREPARATION AS A FUNCTION OF INGREDIENTS CONCENTRATION AND ULTRASONICATION TREATMENT. *Pharmaceutical Sciences*, 23, 129-135., 2017
- 22) Frizzo, M.S.; Feuser, P.E.; Berres, P.H.; Ricci, E.Júnior; Campos, C.E.M; Costa, C.; De Araújo, P.H.H; Sayer, C., Simultaneous encapsulation of zinc oxide and octocrylene in poly (methyl methacrylate-co-styrene) nanoparticles obtained by miniemulsion polymerization for use in sunscreen formulations, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 561, 2019, Pages 39-46.
- 23) Kim, M.H.; Lim, S.G.; Kim, M.K.; Suh, H.S.; Baek, S.H.; and Lee, B.M., Risk assessment of octocrylene in cosmetic products. *Toxicology Letters*, 280, S105, 2017
- 24) Mturi, G. J.; Martincigh B. S., "Photostability of the sunscreensing agent 4-tert-butyl-4-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity", *J. Photochem. Photobiol.: Chemistry*, 200 (2–3), pp. 410–420, 2008
- 25) Afonsoa, S.; Horitaa, K.; Sousae Silva, J.P; Almeida, I.F.; Amaral, M.H.; Lobão, P.A.; Costa, P.C.; Miranda, M.S.; EstevesdaSilva, J.C.G. and Lobo, J.M.S, Photodegradation of avobenzone: Stabilization effect of antioxidants, 2014
- 26) PubChem. "Octinoxate". pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Retrieved 13 November 2021.

- 27) Vielhaber, G.; Grether-Beck, S.; Koch, O.; Johncock, W.; Krutmann, J., "Sunscreens with an absorption maximum of ≥ 360 nm provide optimal protection against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1, and interleukin-6 in human dermal fibroblasts"., *Photochem Photobiol Sci.*, 5 (3): 275–82., March 2006
- 28) Ashby, J.; Tinwell, H.; Plautz, J.; Twomey, K.; Lefevre, P.A., "Lack of binding to isolated estrogen or androgen receptors, and inactivity in the immature rat uterotrophic assay, of the ultraviolet sunscreen filters Tinosorb M-active and Tinosorb S"., *Regul Toxicol Pharmacol.*, 34 (3): 287–91., December 2001
- 29) "NEW-WAVE SUNSCREENS: Active ingredient makers are frustrated by the long list of sunscreens and UV-A testing protocols that are still awaiting FDA decisions". *Chemical & Engineering News*. 83 (15): 18–22. April 11, 2005.
- 30) Aburahma, Mona & Badr-Eldin, Shaimaa. Compritol 888 ATO: A multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. *Expert opinion on drug delivery.*, 11. 1-19., 2014
- 31) Bhattacharjee, J; Verma, G.; Aswal, V.K.; Abhijit, A; Mangal, D.; Nagarsenker, S. and Hassan, P.A., Tween 80-Sodium Deoxycholate Mixed Micelles: Structural Characterization and Application in Doxorubicin Delivery, 2010
- 32) Bartrakova, E.V.; Kabanov, A.V., "Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers"., *J. Control. Release.*, 130 (2): 98–106, 2008
- 33) Parente, M.E.; Andrade, A.O.; Ares, G.; Russo, F. and Jiménez-Kairuz, Á., *Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications*, 2015
- 34) Couteau, C.; Pommier, M.; Papis, E.; Coiffard, L.J.; "Study of the efficacy of 18 sun filters authorized in European Union tested in vitro". *Pharmazie*. 62 (6): 449– , June 2007.
- 35) Sohn, M.; Herzog, B.; Osterwalder, U. and Imanidis, G., Calculation of the sun protection factor of sunscreens with different vehicles using measured film thickness distribution — Comparison with the SPF in vitro., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159, 74–81, 2016
- 36) Pissavini, M.; Tricaud, C.; Wiener, G.; Lauer, A.; Contier, M.; Kolbe, L.; Cabanas, C.T.; Boyer, F.; Nollent, V.; Meredith, E.; Dietrich, E. and Matts, P.J.; Validation of an in vitro sun protection factor (SPF) method in blinded ring-testing, 2018