

CEC  
EDITORE

# COSMETIC® TECHNOLOGY

RIVISTA DI SCIENZE COSMETOLOGICHE

ISSN 1127-6312 Bimestrale. Poste Italiane s.p.a. - Spedizione in Abbonamento Postale - D.L. 353/2003 (convertito in Legge 27/02/2004 n° 46) art. 1, comma 1, LO/MI

5 Set/Ott  
2018



Lievito di pichia

Fungo Reishi

# Nicomenthyl®

Cessione transcutanea di niacina ed efficacia antinquinamento, *detox*, antiossidante

## Gabriele Segalla

Multichem R&D - segalla@multichem.it

## Silvana Giardina

Complife Group - silvana.giardina@complifegroup.com

## Gioia Bizzaro

Complife Group - gioia.bizzaro@complifegroup.com

## Parole chiave

Menthyl Nicotinate

Niacina

Antinquinamento

UV

Azione *detox*

## Riassunto

I meccanismi biochimici della barriera cutanea preposti alla difesa contro agenti di danno endogeni o esogeni sono stati ampiamente studiati (1-3). Da tali studi è ormai emerso che un ruolo fondamentale è svolto dalla niacina (acido nicotinico o vitamina B3), precursore del coenzima NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adenina dinucleotide). Il NAD<sup>+</sup> riveste una funzione essenziale in tutti i processi cellulari attinenti alla difesa immunitaria e alla riparazione del DNA danneggiato da radiazioni UV o composti chimici aggressivi. La carenza di niacina e, conseguentemente, di NAD<sup>+</sup> nei cheratinociti, provoca eventi intracellulari dannosi che possono condurre a perossidazione lipidica, stress ossidativo delle membrane cellulari, invecchiamento cutaneo precoce, eritemi, irritazioni, fino a conseguenze estreme, come ad esempio danni irreversibili al DNA cellulare, perdita di integrità della barriera cutanea, mutazioni, soppressione immunologica, cheratosi attinica, tumori della pelle.

Il mentil nicotinato, derivato lipofilo della niacina, in grado di veicolare la niacina stessa attraverso la pelle senza causare iperemie o irritazioni, è stato sottoposto a quattro test di efficacia *in vitro*, su colture di cheratinociti umani, al fine di valutarne l'efficacia antiossidante, antinquinamento, detossinante e protettiva in generale, nei confronti di quattro agenti di danno (radiazioni UV, agenti ossidanti, polveri urbane e fumo sintetico).

L'attivo attraversa rapidamente la barriera cutanea, si idrolizza a contatto con le esterasi e infine rilascia niacina negli strati sottostanti, attivando così l'azione di contrasto e riparatrice del NAD<sup>+</sup>. I risultati ottenuti da tutti i test eseguiti hanno confermato che il mentil nicotinato è in grado di ottimizzare il metabolismo cellulare e rinforzare efficacemente i meccanismi di difesa delle cellule epiteliali contro tutti e quattro gli agenti di danno testati.

Ciò può essere ritenuto di grande interesse soprattutto in prodotti antinquinamento, *anti-age*, antiradicali liberi, trattamenti di prevenzione della caduta dei capelli, prodotti solari e dopo sole.

## Nicomenthyl®

*Transcutaneous niacin delivery and antipollution, detox, antioxidant efficacy*

### Summary

*The skin barrier biochemical mechanisms responsible for the defence against endogenous and exogenous damaging agents have been widely researched (1-3). These studies evidenced the fundamental role played by niacin (nicotinic acid or vitamin B3), a precursor of the coenzyme NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide). NAD<sup>+</sup> is essential to all cellular processes involved in immune response and repairing DNA damages caused by UV radiation or aggressive chemicals. Niacin deficiency and consequent lack of NAD<sup>+</sup> in keratinocytes, cause intracellular incidents which can lead to lipid peroxidation, oxidative stress of the cell membranes, premature skin ageing, erythema and skin irritation, and eventually more serious consequences, including unrepaired DNA damage, disruption of epidermal barrier integrity, mutagenesis, immune suppression, actinic keratosis and skin cancers. The effects of menthyl nicotinate, a lipophilic derivative of niacin designed to deliver niacin to skin without causing irritation or excessive vasodilation, have been studied through in vitro testing on human keratinocyte cultures, in order to evaluate its antioxidant, antipollution, detox, protective efficacy against four damaging agents (UV radiation, oxidizing agents, urban dust and synthetic smoke). Menthyl nicotinate is capable of rapidly penetrating the skin barrier, hydrolysing on contact with skin esterases, releasing niacin in the underlying cutaneous layers and so activating the NAD<sup>+</sup> defence and repair activities. All tests indicate that menthyl nicotinate enhances cellular metabolism, protection and barrier function in skin against all four damaging agents. These scientific results are of great interest for cosmetic applications to sustain efficacy claims as antipollution, antiaging, anti-free radicals, sun protection, hair loss prevention.*

## Introduzione

Nel presente lavoro si sono volute caratterizzare e indagare nel dettaglio alcune proprietà funzionali del mentil nicotinato (**Fig.1, Tab.1**) mediante una batteria di test *in vitro*.

In particolare, se ne è valutata l'efficacia antiossidante, antinquinamento, detossinante e protettiva in generale, in un modello sperimentale biologico, nei confronti di alcuni agenti di danno, come inquinanti urbani, fumo da sigaretta, agenti ossidanti e radiazioni UV.

È stata scelta a tal proposito una serie di *biomarker* con protocolli di rapida esecuzione e universalmente riconosciuti per il loro significato. Nello specifico, l'efficacia protettiva è stata studiata misurando parametri base come vitalità e metabolismo cellulare (**4,5**); il danno ossidativo è stato investigato attraverso il dosaggio della malondialdeide (**6**), uno dei principali prodotti della perossidazione lipidica e la capacità detossinante mediante l'attività dell'enzima glutatione S-transferasi (**7**), enzima chiave nell'inattivazione e eliminazione di agenti xenobiotici dannosi.

Al fine di inquadrare le *performance* dell'attivo si è deciso di valutarne l'efficacia rispetto all'induzione degli stress in condizioni di esposizione acuta e ripetuta.

## Meccanismo d'azione

Il mentil nicotinato, una volta attraversato lo strato corneo, si idrolizza nei suoi due componenti originali: niacina e mentolo. Quest'ultimo è responsabile della piacevole sensazione di fresco che si avverte già pochi minuti dopo l'applicazione. La niacina, nota anche come vitamina B3 o vitamina PP (*Pellagra Preventive*), è una vitamina idrosolubile del gruppo B, che, una volta attraversata la membrana cellulare dei cheratinociti, dà luogo ad una complessa serie di reazioni biochimiche, che conducono alla sintesi di un importante co-enzima cellulare: il NAD<sup>+</sup> (nicotinammide adenina dinucleotide). Il NAD<sup>+</sup>

svolge un ruolo essenziale per centinaia di enzimi, nel metabolismo ossidativo cellulare, nel ciclo di Krebs, nel meccanismo ossidativo dei lipidi, nella glicolisi, ecc.

La sua forma ridotta, NADH, trasferisce elettroni all'ossigeno e costituisce la principale fonte di ATP (Adenosina tri-

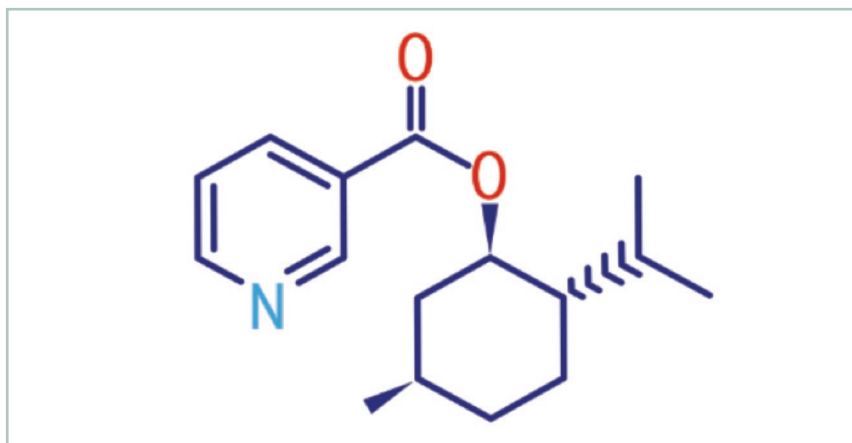


Figura 1 - Struttura molecolare del mentil nicotinato.

Peso molecolare	261,36
Formula molecolare	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub>
Numero CAS	40594-65-8
Numero EINECS	254-991-1
Nome INCI	Menthyl Nicotinate
Numero REACH	01-2120770053-62-0000
Aspetto	Liquido
Colore	Trasparente, incolore APHA (Hazen) ≤20
Odore	Caratteristico, quasi inodore
Purezza (GC-MS) (%)	>99,00
Densità relativa a 20°C	1,031
Solubilità	Insolubile in acqua; solubile in alcool, oli polari, esteri
Punto di ebollizione (p. atm.) (°C)	292,23
Punto di congelamento (°C)	<-20
Tensione di vapore (a 20°C)	10 Pa
Coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua) LogPow	5,09 a 25°C
Tensione superficiale	36,19 mN/m a 22°C
Indice di rifrazione (Abbe Refractometer; 589 nm)	1,5060-1,5074
Percentuali d'uso (%)	Prodotti viso: 0,5-1% Prodotti corpo: 0,5-3%
Sicurezza	Cute: non irritante, non sensibilizzante Non mutageno
<i>Shelf life</i> : >36 mesi. Termostabile. Non necessita dell'aggiunta di alcun conservante o antiossidante né di alcuna condizione particolare di stoccaggio.	
Tabella 1 - Caratteristiche tecniche dell'attivo Mentil nicotinato.	

fosfato), la molecola con cui viene temporaneamente immagazzinata l'energia ottenuta dalla respirazione cellulare e pertanto considerata la "moneta energetica di scambio" dell'organismo.

Il NAD<sup>+</sup> riveste un'importanza fondamentale anche come substrato in reazioni enzimatiche di modificazioni proteiche (trascrizioni delle informazioni del DNA in una molecola complementare di RNA, omeostasi del calcio, meccanismi di riparazione del DNA). Esso è infatti un substrato delle poli-(ADP-riboso)-polimerasi (PARP), una famiglia di enzimi indispensabili nell'attivazione dei meccanismi di difesa contro gli effetti distruttivi causati da agenti ossidanti, quali radiazioni, radicali liberi, specie reattive dell'ossigeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) o carboniliche (RCS, *Reactive Carbonyl Species*). Il NAD<sup>+</sup> è un substrato anche delle cosiddette sirtuine o proteine Sir2, una classe di proteine ad attività enzimatica, che mediano fenomeni quali l'invecchiamento cutaneo, la regolazione della trascrizione, l'apoptosi, la resistenza allo stress e influiscono peraltro sull'efficienza energetica e la vigilanza durante le situazioni a basso introito calorico.

A seguito dell'insulto tossico, soprattutto quando i meccanismi di difesa dei tessuti epiteliali sono indeboliti dal mancato apporto di niacina/NAD<sup>+</sup> e dalla conseguente inibizione delle PARP e delle sirtuine, si possono verificare eventi intracellulari come perossidazione lipidica, stress ossidativo delle membrane cellulari, blocco delle pompe ioniche, blocco della sintesi di ATP e, conseguentemente, invecchiamento precoce della pelle, perdita di integrità della barriera cutanea, eritemi, irritazioni, fino a conseguenze estreme, come ad esempio danni al DNA cellulare, mutazioni, soppressione immunologica, tumori della pelle (1).

Recenti studi hanno infatti dimostrato che i cheratinociti depauperati di niacina, a causa dell'accumulo di ROS e RCS prodotti dall'insulto di radiazioni UV e della conseguente *défaillance* dei succitati meccanismi enzimatici di difesa della barriera cutanea e di riparazione del DNA, sono risultati molto più sensibili all'esposizione a raggi UV, con conseguenze che possono condurre persino a eventi come l'iperplasia epidermica ipercheratosica, la cheratosi attinica e il carcinoma squamoso cellulare (2).

I risultati che evidenziamo in anteprima nel presente lavoro, descrivono come l'attivo, derivato lipofilo della niacina, attraversando rapidamente (proprio grazie alla sua lipofilia) la barriera cutanea, rilasciando niacina e agendo attraverso i meccanismi biochimici cellulari sopra descritti, senza causare iperemie o irritazioni, ha mostrato una significativa effi-

cazia protettiva, antiossidante, riparatrice e detossinante rispetto ad un ampio ed eterogeneo spettro di agenti di stress sia ambientali che endogeni.

## Materiali e Metodi

Per gli studi in questione sono state utilizzate colture di cheratinociti (HaCaT) mantenute *in medium* di coltura completo (Dulbecco's Modified Eagle Medium arricchito con siero fetale bovino al 10%).

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti in numero controllato ( $1 \times 10^4$  cellule/pozzetto) e mantenute per 24 ore in condizioni standard di coltura (37°C, 95% UR, 5% CO<sub>2</sub>) fino alla piena confluenza.

Data la natura lipofila del mentil nicotinato (nome commerciale: Nicomenthyl®) si è proceduto ad una prima solubilizzazione in olio di mais e successivamente in terreno di coltura. Sono state testate tre concentrazioni della sostanza (rispettivamente 0,050, 0,025 e 0,013%), scelte a seguito di un test di citotossicità preliminare. Nel protocollo sperimentale sono state incluse condizioni di controllo negativo (CTR), ovvero cellule *in medium* di coltura addizionato dei veicoli, e condizioni di controllo positivo (CTR<sup>+</sup>), ossia cellule trattate unicamente con l'agente di danno prescelto. La prima corrisponde alla condizione basale non danneggiata e la seconda alla massima condizione di danno. L'efficacia del prodotto è stata misurata rispetto a queste due condizioni di riferimento.

Di seguito vengono riportati gli agenti di danno prescelti per gli studi di efficacia svolti con le relative concentrazioni nei terreni di coltura. Come inquinanti urbani sono state utilizzate polveri sottili e fumo sintetico, le prime nella formula di una miscela certificata e caratterizzata di PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons), PCB (polychlorinated biphenyl), pesticidi clorurati, su matrici PM 10 (a concentrazioni 0,25 e 0,125%, rispettivamente in esposizione singola e ripetuta), e il secondo (riproducendo l'insulto sulla pelle derivante dal fumo di sigaretta) come miscela di nicotina, cadmio, formaldeide e etilcarbammato in parti uguali (a concentrazioni 0,00125 e 0,0006%, rispettivamente in esposizione singola e ripetuta). Come agente pro-ossidante classico è stata scelta il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alla concentrazione 50 e 25 µM, rispettivamente in esposizione singola e ripetuta), e come agente di fotoinvecchiamento la radiazione UV emessa attraverso simulatore solare Suntest CPS<sup>+</sup> certificato (dose complessiva di 300 J/m<sup>2</sup> in singola esposizione e distribuita in tre esposizioni differenti a distanza di 24 ore una dall'altra). Nell'esposi-

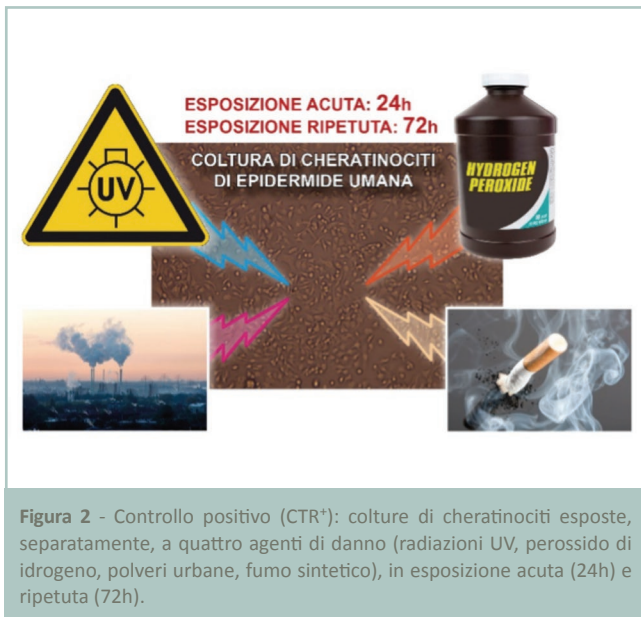


Figura 2 - Controllo positivo (CTR<sup>+</sup>): colture di cheratinociti esposte, separatamente, a quattro agenti di danno (radiazioni UV, perossido di idrogeno, polveri urbane, fumo sintetico), in esposizione acuta (24h) e ripetuta (72h).

zione acuta gli agenti di danno e il prodotto sono rimasti a contatto per 24 ore, mentre in quella ripetuta per 72 ore consecutive (**Fig.2**).

Di seguito vengono riportati i parametri oggetto dello studio e le relative metodiche biochimiche utilizzate. Si tratta di saggi colorimetrici semplici, standardizzati e accurati. Come indicatore di protezione è stata calcolata la variazione di ciascun parametro rispetto al controllo positivo CTR<sup>+</sup>, esposto unicamente all'agente di danno.

La **vitalità cellulare** è stata valutata mediante MTT test (3,(4,5-dimethylthiazol-2)2,5 difeniltetrazolium bromide) (**4**).

Il saggio si basa sulla riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio di colore giallo da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi in cristalli di formazano di colore blu/violaceo. La reazione pertanto può avvenire solo nelle cellule metabolicamente attive e il valore della densità ottica ottenuta può essere correlata al quantitativo di cellule vitali presenti. Dopo la colorazione con MTT le cellule sono state incubate in isopropanolo e infine le assorbanze delle soluzioni sono state lette mediante lettore micropiastre a 570 nm.

Per ciascuna condizione sperimentale il rapporto tra la media della densità ottica delle colture trattate e la media della densità ottica dei controlli negativi determina il tasso di vitalità cellulare.

Il **metabolismo proteico** è stato misurato attraverso la determinazione della sintesi di proteine secondo il metodo di Lowry *et al* (**5**). Come nel metodo del biuretto, in ambiente alcalino gli ioni Cu<sup>2+</sup> si complessano alle proteine e catalizzano la reazione di ossidazione dei residui tirosinici e tripto-

fanici. Tale ossidazione provoca la riduzione del reattivo di Folin-Ciocalteu che dal caratteristico colore giallo vira verso una colorazione blu, tanto più intensa quanto più proteine sono presenti nella matrice biologica.

I risultati sono espressi come contenuto di proteine in µL/mL nel terreno di coltura.

Il **danno alla componente lipidica** viene studiato attraverso il dosaggio della malondialdeide (MDA), utilizzata come indice dello stress ossidativo legato in modo specifico alla componente lipidica. Per determinare i livelli di lipoperossidi è stato utilizzato il metodo colorimetrico di Erdelmeier e collaboratori (**6**). Il saggio si basa sulla capacità di un cromogeno, l'N-metil-2-fenilindolo (NMPI) di reagire con la MDA a 45°C a pH acido con la produzione finale di un cromoforo stabile di colore blu che ha un picco di assorbimento a 586 nm.

La determinazione quantitativa sfrutta una curva di calibrazione costruita con concentrazioni note e crescenti di MDA standard. I risultati sono espressi come concentrazione di MDA (µM) in 100 µL di omogenato cellulare.

Lo studio dell'**attività detossinante** è stato effettuato andando a valutare l'attività della glutazione S-transferasi (GST), gruppo di isoenzimi importanti per la detossinazione dei tessuti. Questi enzimi proteggono le cellule contro le sostanze tossiche coniugandole con gruppi tiolici del glutazione per la successiva eliminazione.

Ottenuti gli omogenati delle colture cellulari nelle diverse condizioni sperimentali, la determinazione dell'attività detossinante è stata effettuata monitorando la capacità dell'enzima di coniugare il glutazione con il 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) che produce un complesso stabile con picco di assorbimento a 340 nm.

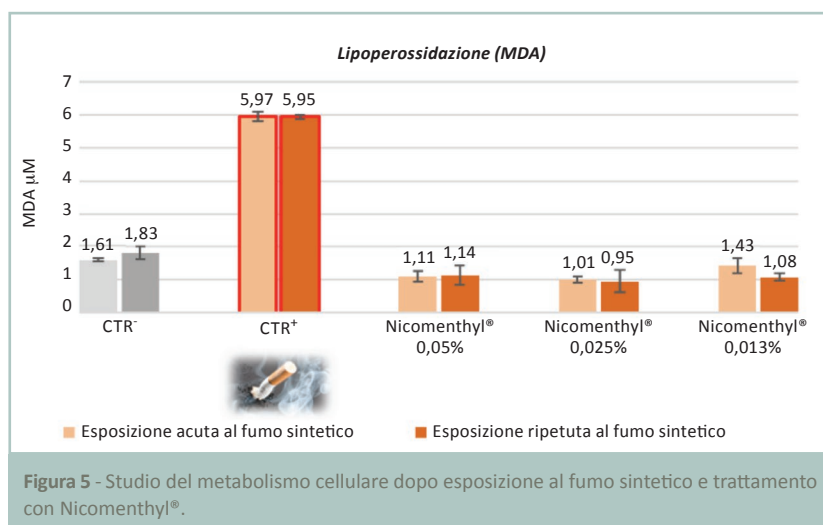
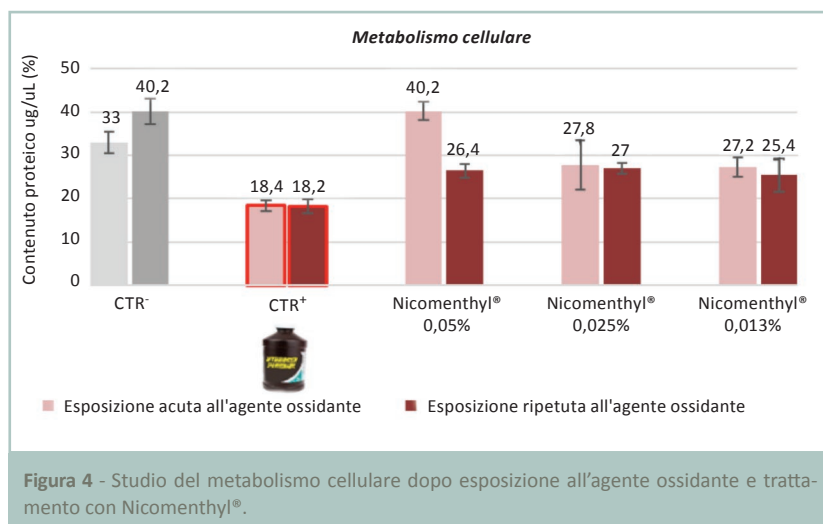
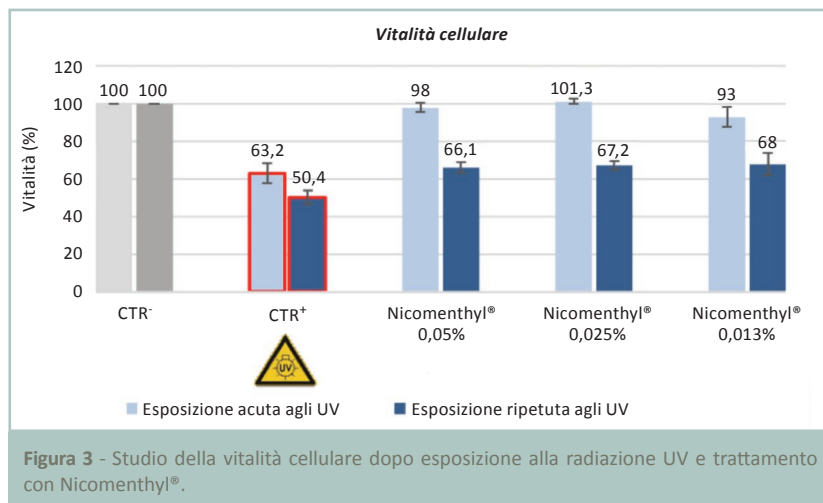
L'attività della GST viene riportata in nmoli/mL/min sugli omogenati cellulari.

## Risultati e Discussione

Per snellire la mole di dati ottenuti in questa sperimentazione e facilitarne l'interpretazione si è scelto di riassumere l'efficacia protettiva del prodotto, nei confronti dei diversi agenti di danno considerati, riportando i grafici più significativi e rappresentativi per ciascun parametro indagato.

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante test t di Student. Tutte le variazioni registrate rispetto al controllo positivo CTR<sup>+</sup> sono risultate statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

Esaminando nel dettaglio le risposte ai singoli stress, lo studio di efficacia protettiva nei confronti della radiazione



UV dimostra che la sostanza testata protegge in modo completo la vitalità della coltura cellulare. Si registrano valori di vitalità nella condizione di induzione del danno in singola esposizione del 100%, paragonabili quindi alla

condizione basale non stressata e valori di quasi il 70% nel caso del trattamento ripetuto (**Fig.3**).

L'ingrediente protegge in modo completo e incrementa il metabolismo rispetto ai livelli basali del controllo negativo nel trattamento con l'agente di danno pro-ossidante. Vengono riportate variazioni rispetto al controllo positivo di quasi il 120% nel trattamento in acuto e di quasi il 50% nel trattamento ripetuto (**Fig.4**).

Lo studio di efficacia antiossidante nel trattamento con fumo sintetico dimostra una protezione completa e una riduzione dei livelli basali del contenuto di lipoperossidi nella coltura cellulare trattata con la sostanza in esame. Si registrano variazioni di oltre l'80% in entrambi i casi rispetto al controllo positivo stressato con solo l'agente di danno (**Fig.5**).

La materia prima presenta inoltre un'attività detossinante ben evidente nello studio dell'attività enzimatica della glutathione S-transferasi in presenza di polveri urbane come induttori di stress. La sostanza è in grado di riportare l'attività della GST, significativamente ridotta nella condizione esposta all'agente di danno ambientale, ai livelli basali del controllo negativo. Vengono trovate variazioni di oltre il 50% rispetto al controllo positivo danneggiato (**Fig.6**).

Riassumendo, dai risultati ottenuti (**Tabb.2-4**) si evince che il trattamento delle colture cellulari con gli agenti di danno ha indotto significative variazioni nei parametri biochimici monitorati.

Per contro, il trattamento delle cellule con gli induttori di stress e il prodotto testato ha evidenziato un significativo controllo delle alterazioni provocate dagli agenti di danno, riportando i parametri monitorati ai livelli basali e talvolta esplicitando una funzione migliorativa.

## Conclusioni

I risultati ottenuti in questa indagine preliminare *in vitro* hanno dimostrato che l'ingrediente ha significative po-

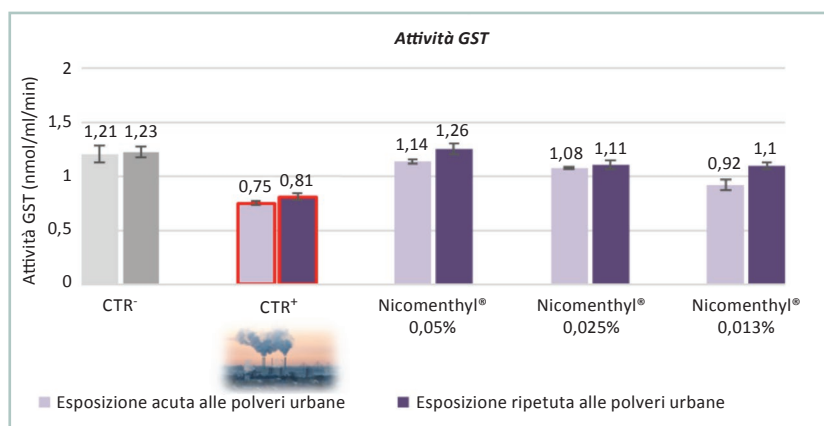


Figura 6 - Studio dell'attività della GST dopo esposizione alle polveri urbane e trattamento con Nicomenthyl®.

tenzialità protettive nei confronti dei diversi agenti di danno considerati sia in esposizione singola che ripetuta. Nello specifico, viene rilevata un'attività antiossidante, detossinante, antinquinamento, attivatrice del metabolismo in generale e protettiva nel sistema *in vitro* considerato.

La penetrazione completa dell'ingrediente nell'arco delle 24 ore (dati sperimentali ottenuti con modello epidermide ricostruita, non riportati in questo articolo, ma che saranno comunque oggetto di una prossima pubblicazione) aggiunge una connotazione positiva e assolutamente confortante sulle potenzialità di efficacia della sostanza, che oltrepassa la barriera cutanea e raggiunge il sito anatomico sottostante dove può esplicare la sua azione.

La sua idrolisi e il conseguente rilascio di niacina nel distretto cutaneo attivano e supportano le succitate reazioni enzimatiche proprie dei processi di rinnovo cellulare epiteliale, della funzione barriera, del consolidamento del sistema immunitario, dei meccanismi di protezione e riparazione del DNA (3).

Il Nicomenthyl® può pertanto essere considerato un valido supporto cosmetologico al fine di contrastare efficacemente tutti gli effetti dannosi provocati sulla pelle da radiazioni UV, agenti ossidanti, radicali liberi, polveri urbane, fumi, tossine. Effetti a cui oggi, purtroppo, la nostra pelle è sempre di più esposta.

Già apprezzato per le sue funzioni di potente attivatore del microcircolo cutaneo, veicolante modulatore di altri attivi lipofili e piacevole agente sensoriale caldo-freddo, il composto ha dimostrato di essere anche un principio attivo di assoluta efficacia in tutte quelle formulazioni cosmetiche (come per es. prodotti solari e doposole per pelli delicate o per bambini, preparati antinquinamento, *antiage*, antiradicali liberi per pelli sensibili, trattamenti di prevenzione della caduta dei capelli, ecc.) in cui si ricerca il massimo effetto protettivo, antiossidante, antinquinamento, detossinante e riparatore.

**Riepilogo % variazione parametri biochimici nelle colture aggredite con agente di danno (CTR+) rispetto ai valori basali (CTR)**

Agente di danno	Test	Esp. Acuta 24h	Esp. Ripetuta 72h
Radiazioni UV	Vitalità cellulare	↓ 63	↓ 50
Agente ossidante	Metabolismo cellulare	↓ 56	↓ 45
Fumo sintetico	Lipoperossidazione MDA	↑ 371	↑ 325
Polveri urbane	Attività GST	↓ 62	↓ 66

Tabella 2 - Valori delle % di variazione dei parametri biochimici monitorati dopo ogni aggressione subita dalle colture cheratinocitiche.

**Riepilogo % recupero dei parametri biochimici dopo trattamento con Nicomenthyl® (NM) rispetto ai valori basali (CTR)**

Agente di danno	Test	NM 0,05%		NM 0,025%		NM 0,013%	
		Esp. Ac.24 h	Esp. Rip.72 h	Esp. Ac.24 h	Esp. Rip.72 h	Esp. Ac.24 h	Esp. Rip.72 h
Radiazioni UV	Vitalità cellulare	↑ 98	↑ 66	↑ <b>101</b>	↑ 67	↑ 93	↑ 68
Agente ossidante	Metab. cellulare	↑ <b>122</b>	↑ 66	↑ 84	↑ 67	↑ 82	↑ 63
Fumo sintetico	Lipopeross. MDA	↓ <b>69</b>	↓ <b>62</b>	↓ <b>63</b>	↓ <b>52</b>	↓ <b>62</b>	↓ <b>59</b>
Polveri urbane	Attività GST	↑ 94	↑ <b>102</b>	↑ 90	↑ 90	↑ 76	↑ 90

Tabella 3 - Valori delle % di recupero delle colture cheratinocitiche trattate con Nicomenthyl 0,05 - 0,025 e 0,013% dopo aggressioni con l'agente di danno, rispetto ai valori basali del controllo negativo (CTR). Sono riportati in grassetto i valori addirittura migliorati rispetto a quelli basali.

**Riepilogo % recupero dei parametri biochimici dopo trattamento con Nicomenthyl® (NM) rispetto ai valori del controllo positivo danneggiato (CTR+)**

Agente di danno	Test	NM 0,05%		NM 0,025%		NM 0,013%	
		Esp. Ac.24 h	Esp. Rip.72 h	Esp. Ac.24 h	Esp. Rip.72 h	Esp. Ac.24 h	Esp. Rip.72 h
Radiazioni UV	Vitalità cellulare	↑ 55	↑ 31	↑ 60	↑ 33	↑ 47	↑ 35
Agente ossidante	Metab. cellulare	↑ 119	↑ 45	↑ 51	↑ 48	↑ 48	↑ 40
Fumo sintetico	Lipopeross. MDA	↓ 81	↓ 81	↓ 83	↓ 84	↓ 76	↓ 82
Polveri urbane	Attività GST	↑ 52	↑ 56	↑ 44	↑ 37	↑ 23	↑ 36

Tabella 4 - Valori delle % di recupero delle colture cheratinocitiche trattate con Nicomenthyl 0,05 - 0,025 e 0,013% dopo aggressioni con l'agente di danno, rispetto ai valori del controllo positivo danneggiato (CTR+).

Altri studi futuri potranno essere utili per approfondire le singole attività inizialmente investigate in questa prima sperimentazione con ulteriori *end-points*, utilizzando differenti approcci sperimentali per ottenere un quadro più completo possibile del meccanismo d'azione della materia prima in questione. Nell'ottica di estendere le conoscenze scientifiche in una prospettiva futura, sarà certamente di interesse verificarne l'efficacia anche in *trial* clinici, al fine non solo di confermare i dati ottenuti dalla presente sperimentazione *in vitro*, ma anche studiarne ulteriori e promettenti aspetti funzionali e applicativi.

## Bibliografia

1. Benavente CA, Jacobson MK, Jacobson EL (2009) NAD in Skin: Therapeutic Approaches for Niacin. *Current Pharmaceutical Design* 15(1):29-38
2. Jacobson EL, Hyuntae K, Moonsun K, Georg T. Wondrak GT, Jacobson MK (2005) Developing Topical Prodrugs for Skin Cancer Prevention  
Reprint from: Alberts David S, Hess Lisa M (Eds) *Fundamentals of Cancer Prevention* pp 139-160 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2005)
3. Jacobson EL, Kim H, Kim M, Williams JD, Coyle DL *et al* (2007) A topical lipophilic niacin derivative increases NAD, epidermal differentiation and barrier function in photodamaged skin. *Experimental Dermatology* 16(6):490-499
4. MTT Assay - Protocol no 17, EURL ECVAM
5. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, RJ Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275
6. Erdelmeier I, Gérard-Monnier D, Yadan JC, Chaudière J (1998) Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11(10):1184-1194
7. Moatamedi Pour L, Farahnak A, Molaei Rad M, Golmohamadi T, Eshraghian M (2014) Activity Assay of Glutathione S-Transferase (GSTs) Enzyme as a Diagnostic Biomarker for Liver Hydatid Cyst *in vitro*. *Iran J Public Health* 43(7):994-999