

Caratterizzazione di composti naturali da fanghi termali solfurei: azioni di protezione dal danno ossidativo e riduzione dei processi infiammatori

Characterization of natural compounds of sulphurous thermal mud: protecting action against oxidative damage and reduction of inflammatory processes

¹S. Mazzulla, ¹V. Nicoletta, ²S. De Stefano, ²M.Morrone, ³R.Bruno, ¹G. Martino

Clin. Term. 54 (3-4):?-?, 2007

RIASSUNTO – I fanghi termali solfurei, tra le risorse disponibili nell’ambito della medicina termale, hanno una considerevole valenza per la loro efficacia terapeutica. Un approccio sperimentale, che prevede la caratterizzazione biochimica dei fanghi termali solfurei e della matrice organica derivante dalla microflora algale, ci ha consentito di studiare i potenziali effetti biologici in seguito all’applicazione topica del composto naturale. Gli effetti biologici considerati sono: I meccanismi d’azione nei processi contro le infiammazioni dei distretti cutanei e osteoarticolari e i processi di riduzione del danno ossidativo. La sinergia dei composti solfurei, presenti nelle acque e nei fanghi termali, con quelli dosati nel composto naturale nel quale si rileva fitosteroli, carotenoidi, vitamine lipo ed idrosolubili, polifenoli, fornisce una correlazione fra essi, in termini di riduzione dei processi infiammatori con regressione delle lesioni cutanee e di protezione dal danno ossidativo (1, 2).

ABSTRACT – Sulphurous thermal mud, which is one of main resources available in thermal medicine, has remarkable therapeutic effects/ has a remarkable value owing to its therapeutic effects . An experiment /experimental test on the biochemical features of sulphurous thermal mud and on its organic matrix -which derives from the algal microflora – has allowed us to study the biological effects consequent to a topic application of thermal mud natural compounds.

The biological effects we observed were: (a) activation of treating mechanisms in the processes of inflammation of some cutaneous and osteoarticular areas and (b) reduction of the oxidative damage. The synergic action of the sulphurous components present in mineral water and of those detected in thermal mud (the later ones including: phytosterols, carotenoid, lipo and idrosoluble vitamins, polyphe-nol) results into a reduction of inflammatory processes with a regression of cutaneous lesions and a protection against oxidative damages.

PAROLE CHIAVE: Fanghi termali solfurei, fitosteroli, patologie cutanee

KEY WORDS: Sulphureous thermal mud, phytosterols, skin pathologies

¹Università della Calabria Dipartimento di Biologia Cellulare; ²Terme Luigiane Guardia Piemontese, Acquappesa (CS)

³Università della Calabria, Dipartimento Farmaco Biologico

Scopo della ricerca

L'efficacia biologica del fango termale e dei prodotti del metabolismo della microflora algale dipende in gran parte dal contenuto in composti antiossidanti e antinfiammatori, del tipo caroteni, retinoli, tocoferoli, polifenoli e fitosteroli (3). Pertanto abbiamo proposto un protocollo sperimentale, teso ad individuare tali sostanze nel fango termale. La nostra ipotesi è che tali sostanze possono conferire e implementare un importante valore biologico aggiunto alle potenzialità terapeutiche dei fanghi termali solfurei.

Azione dei carotenoidi

I carotenoidi sono sostanze liposolubili, formate dalla condensazione di più unità isopreniche; il cromoforo è costituito da numerosi doppi legami coniugati. La loro sintesi, a partire dall'acetil CoA, avviene solo nei vegetali. Essi esplicano un importante ruolo nella protezione delle cellule contro l'ossidazione. Tale attività è in relazione alla loro struttura chimica ed è direttamente attiva a basse tensioni d'ossigeno (4). La base della protezione dei carotenoidi contro le reazioni ossidative è la capacità dei pigmenti di interrompere il processo di trasferimento di energia (5).

Funzioni biologiche della Vit. E

Poiché gli acidi grassi insaturi proteggono le strutture cellulari dai processi degenerativi dello strato dermico, i processi perossidativi possono provocare la produzione di sostanze che alterano il regolare ciclo vitale dell'epidermide. Tali eventi possono causare danni

a carico della cute, quali perdita di elasticità, desquamazione, e atrofia del derma (6).

I tocoferoli svolgono azioni di protezione dallo stress ossidativo cellulare, grazie all'inserimento delle molecole fra i fosfolipidi delle membrane biologiche, con azione inibitoria dei lipoperossidi (7). Tale meccanismo contribuisce ad aumentare la stabilità di fronte a diversi stimoli antigenici, infiammatori e chimico-fisici (8).

Funzioni biologiche della Vit. A

La vitamina A è un alcool a 20 atomi di carbonio, costituito da un anello β -iononico e da una catena laterale polinsatura per doppi legami collegati trans (9). L'attività biologica della vitamina A è attribuibile sia al retinolo ed ai suoi analoghi che a vari carotenoidi, i quali possiedono attività provitaminica (10). La vitamina A è coinvolta nella differenziazione cellulare e promuove la nutrizione e la resistenza sulla cute (9). Inoltre, potenzia l'azione cheratoplastica, grazie all'effetto sinergico con i composti dello zolfo presenti nel fango termale.

Azioni biologiche dei Fitosteroli

I fitosteroli sono una classe di composti di origine vegetale, la cui struttura è simile al colesterolo, differendo da questo, a livello della catena laterale, per la presenza di un numero diverso di gruppi metilici o di doppi legami. Ricerche condotte, su modelli animali con fitosteroli, hanno dimostrato l'azione protettiva dal danno ossidativo per il ripristino del rapporto glutatione/ glutatione ossidato, compromesso da phorbol esters in colture di macrofagi RAW 264.7 (11). Essi presentano proprietà antin-

fiammatorie simili ai cortisonici ed inducono la riduzione della secrezione di citochine proinfiammatorie (12). Inoltre, i fitosteroli riducono l'edema indotto sperimentalmente (13). È stato dimostrato anche l'effetto antipiretico, comparabile con quello fornito dall'aspirina (14).

Materiali e Metodi

Caratterizzazione biochimica dei fanghi termali

Analisi quantitativa e qualitativa delle Vitamina A ed E

L'identificazione delle Vitamina A ed E, è ottenuta mediante tecniche di cromatografia ad alta prestazione (HPLC), utilizzando un cromatografo SHIMADZU® CR4A. Preliminarmente si effettua un'estrazione in fase solida (SPE) (3). Si utilizza un tubo Supelclean® con impaccamento C18 da 100 mg. Sono stati utilizzati 3,3 g di campione, disidratato fino a peso costante, risospeso in n-esano ed omogenato in un apparecchio di Potter-Elvehjem. Successivamente si condiziona il tubo con due volumi di n-esano e si applica il campione. L'eluato contenente la frazione vitaminica è essiccato sotto vuoto e risospeso in metanolo. L'analisi è stata condotta in condizioni isocratiche, utilizzando una fase mobile: Metanolo/Acqua 98:2 (V/V), una colonna C18 Supelco® RP-100 Å, 4,6 mm I.D. - 5µ, flusso 1 ml/min. e monitorato a 290 e 325 nm per l'identificazione del DL-alfa Tocoferolo e il Retinolo Acetato. Sono stati utilizzati 0,5 µg di standards puri per HPLC, Sigma®: DL- alfa Tocoferolo e Retinolo Acetato. Vol. di iniezione 20µl.

Estrazione della Frazione insaponificabile dai fanghi termali

La frazione insaponificabile è recuperata in seguito alla saponificazione della massa lipidica precedentemente estratta in una soluzione idroalcolica di KOH 2N (15). Dopo l'estrazione con etere, si allontana il sovraraffinato sottovuoto e si risospende in metanolo.

Analisi quantitativa e qualitativa della frazione sterolica

I fitosteroli sono stati estratti dalla frazione insaponificabile della matrice organica dei fanghi termali. Si è proceduto all'analisi mediante cromatografia ad alta prestazione (HPLC) mediante cromatografo SHIMADZU® CR4A. L'analisi è stata condotta in condizioni isocratiche, utilizzando una fase mobile ternaria: Metanolo/Etano/Acqua 86:10:4 (V/V), una colonna C18 Supelco® RP-100 Å, 4,6 mm I.D. - 5µ, flusso 1 ml/min. e monitorato a 215 nm. Sono stati utilizzati 0,2 µg di standards puri per HPLC, Sigma®: Colesterolo, β-Sitosterolo, Campesterolo e Stigmasterolo. Vol. di iniezione 20µl.

Dosaggio dei prodotti di perossidazione lipidica in membrane eritrocitarie provenienti da soggetti affetti da psoriasi

Allo scopo di misurare i prodotti di degradazione lipidica nelle membrane eritrocitarie, provenienti da soggetti affetti da psoriasi (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile) di età compresa tra 22 e 75 anni, è stato effettuato il saggio del MDA (malonildialdeide) (16). Questo metodo si basa sul fatto che i lipidi perossidati e il TBA (acido tiobarbiturico)

reagiscono per formare un pigmento rosa con un assorbimento massimo a 532 nm (Fig. 1). Le misure sono state messe a confronto con quelle ottenute, alle stesse condizioni sperimentali, da campioni di sangue provenienti da soggetti sani (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile).

500µl di sangue prelevato in provette eparinizzate, sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS (phosphate buffer saline). Si centrifuga a 700 g per 5' a 4°C. Al pellet così ottenuto, vengono aggiunti 2,5 ml di TCA (trichloroacetic acid) 100g/L, si agita e si incuba a 100°C per 15'. Si lascia raffreddare e si centrifugata per 5' a 700g. Al sovra natante recuperato è aggiunto 1 ml di 0,67% di TBA in Na OH 0.05 M. Si incuba 100°C per 15'. Si lascia raffreddare, quindi si procede al dosaggio a 532 nm con uno spettrofotometro SHIMADZU ® UV 2100.

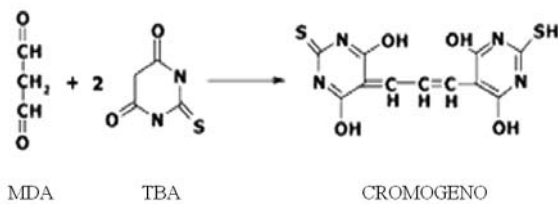


Fig. 1 La reazione tra i lipidi perossidati, rappresentati come equivalenti di MDA (Malonaldeide) con il TBA (Acido Tiobarbiturico) formano un cromogeno rilevabile a 532 nm.

Risultati e discussione

Determinazione di vitamine liposolubili

L'analisi, per confronto dei tempi di ritenzione e delle aree rispetto ai cromatogrammi standard, dà indicazioni sulla presenza di vi-

tamina A e vitamina E (Fig. 2) nella matrice organica dei fanghi termali.

concentrazioni vitaminiche ottenute:

Vit.A=16,23±0,13(SD) mg/100 gr.

Vit.E=0,32 ±0,012(SD) mg/100 gr.

L'azione sinergica delle vitamine A ed E presenti nei fanghi termali, conferma l'azione protettiva dallo stress ossidativo cellulare mediante l'inibizione di prodotti perossidativi, responsabili dell'alterazione del ciclo epidermico. Tale azione determina il recupero della fluidità della membrana cellulare, il miglioramento dei parametri di elasticità ed idratazione, la riduzione dei processi di atrofia dermica e desquamazione (7, 8).

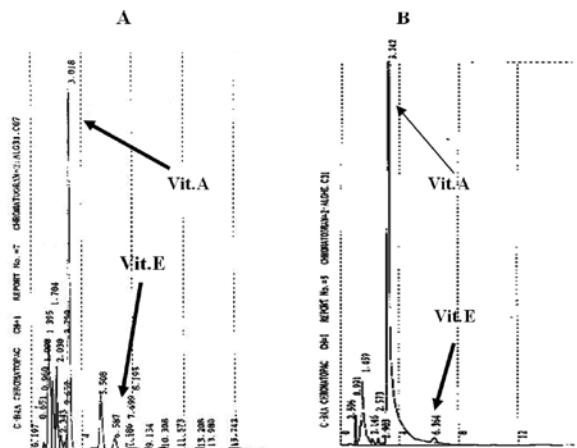


Fig. 2. Cromatogramma degli standards Retinolo Acetato e D-L α Tocoferolo 0,2 µg (A), Cromatogramma dell'estratto da fanghi termali (B) Fase mobile: Metanolo-Ammonio Acetato 0,05M. Flusso 1ml al min λ=270 nm vol. di iniezione 20 µl.

Frazione insaponificabile

La frazione insaponificabile esplica un'importante azione protettiva dal danno ossidativo e antinfiammatoria per il suo contenuto in composti ad azione protettiva quali i fitosteroli ed i tocoferoli (17,18,19). Dall'indagine condotta nel nostro laboratorio si evince che la concentrazione di frazione insaponificabile è pari al 2.85% della massa lipidica estratta.

Se questo dato è confrontato con quelli individuati in letteratura (17), la concentrazione percentuale media della frazione insaponificabile dei fanghi termali solfurei di Guardia Piemontese è paragonabile a quella di altre matrici vegetali ed a volte è superiore (Tab. 1).

Tabella 1. Media % di frazione insaponificabile di alcune matrici vegetali

Matrice Vegetale	Media% di Fraz. Insaponificabile da alcune matrici vegetali
Matrice organica	
fango termale	2,85
Olio d'avocado	4,00
Olio germe di grano	4,10
Olio germe di mais	1,85
Olio di soja	1,00
Olio di sesamo	1,25
Olio di cartamo	1,35
Olio di mandorle	0,75
Olio di riso	2,00
Olio di lino	1,00
Olio di carota	1,50
Olio d'oliva	1,00
Olio d'arachidi	0,60
Olio di nocciola	0,50
Burro di palma	0,45

Misura della perossidazione lipidica

L'attività antiossidante e la perossidazione lipidica è fortemente influenzata in seguito a

processi infiammatori della pelle (20). Il sistema antiossidante protegge le cellule dalle lesioni ossidative e previene la formazione di prodotti di ossidazione, come la malonildialdeide (MDA), capaci di indurre danno proteico, apoptosi o rilascio di mediatori pro-infiammatori, come le citochine.

Pertanto, è stato proposto un protocollo che prevede la valutazione dello stress ossidativo in soggetti affetti da psoriasi, prima e dopo un ciclo terapeutico della durata di 12 giorni con fanghi termali. I risultati ottenuti confermano l'efficacia nel ripristino e il miglioramento del trofismo della cute dopo un ciclo di 12 giorni di fango terapia. I prodotti di perossidazione lipidica espressi come equivalenti di MDA (malonildialdeide), sono nettamente diminuiti nei soggetti affetti da psoriasi e statisticamente non distinguibili con i parametri di controllo, costituiti dai soggetti sani (Fig. 3).

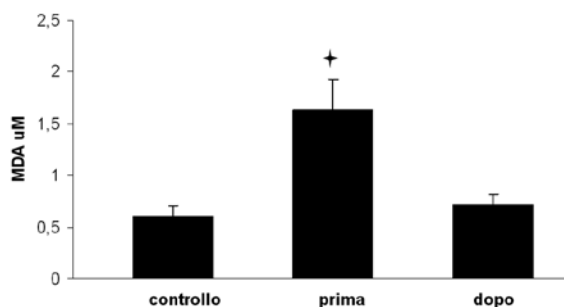


Fig. 3. Rappresentazione grafica dei prodotti di MDA (malonildialdeide) nelle membrane eritrocitarie provenienti da soggetti di controllo e soggetti affetti da psoriasi prima e dopo il trattamento termale.

I valori ottenuti sono la media di 10 determinazioni indipendenti. La variazione rispetto ai controlli è significativa per $p < 0.05$ (t di Student)

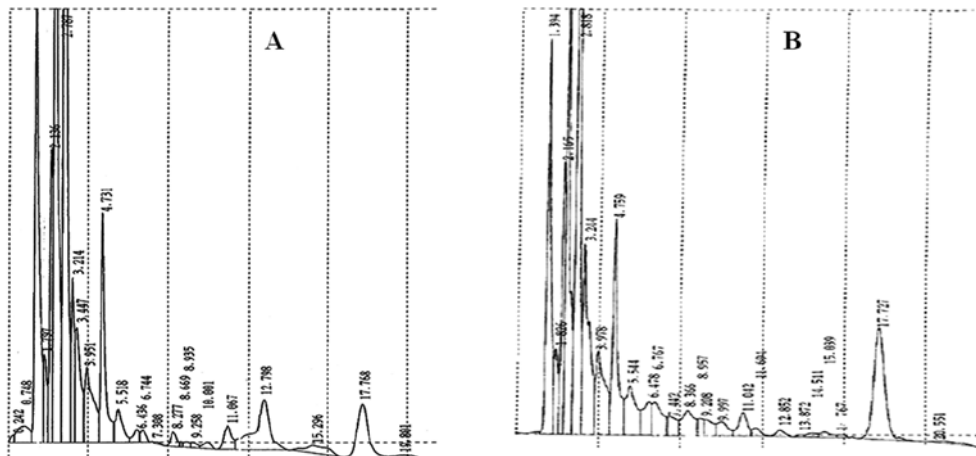


Fig 4. Cromatogramma dello standard di fitosteroli: Stigmasterolo, Campesterolo, Beta Sitosterolo 0,2 µg (A) - Cromatogramma dell'estratto da fanghi termali (B) Fase mobile: Metanolo/Etano/lo/Acqua 86:10:4. Standard interno, Colesterolo 0,2µg, Flusso 1ml al min λ=270 nm vol. di iniezione 20 µl.

Presenza dei fitosteroli nei fanghi termali

Il dosaggio quantitativo totale della frazione sterolica è pari a 52,3±4,63 (S.D.) mg/100g di peso fresco. La presenza di questa classe di composti è in relazione con l'efficacia antinfiammatoria

Dal confronto con lo standard è possibile evidenziare che Il β-sitosterolo è il fitosterolo maggiormente rappresentato: 50,7 mg/100 ml(SD), pari al 97% del totale (Tab. 2, Fig. 4).

La presenza di fitosteroli, conferma l'utilità dell'applicazione topica dei fanghi termali solfurei nella riduzione dei processi infiammatori. I fitosteroli oltre all'azione antinfiammatoria, hanno dimostrato di possedere azioni di stimolo per la produzione di collagene nei condrociti articolari, sinoviociti e fibroblasti della cute (18,19).

Tabella 2. A: tempi di ritenzione degli standards; B: tempi di ritenzione dell'estratto da fanghi termali

Tempi Rit. min.	A Standards	Tempi di Ritenzione min.	B Estratto Fanghi Termali
11.067	Colesterolo	11.042	Colesterolo (S.I)
12.798	stigmasterolo	12.852	stigmasterolo
15.296	campesterolo	15.039	campesterolo
17.768	β-sitosterolo	17.727	β-sitosterolo

Conclusioni

L'azione sinergia dei composti solfurei, presenti nelle acque e nei fanghi termali, con quelli dosati nei fanghi termali fornisce una correlazione fra essi, in termini di riduzione dei processi infiammatori con regressione delle lesioni cutanee e di protezione dal danno ossidativo.

I composti dello zolfo agiscono sulla cute determinando un incremento della velocità e del volume di flusso del microcircolo cutaneo, facilitando il ripristino dello stato fisiologico della cute.

I valori elevati dei prodotti di perossidazione lipidica nelle membrane eritrocitarie sono fortemente influenzati dai processi infiammatori della cute quali psoriasi e dermatite atopica (20). Lo stress ossidativo nelle membrane eritrocitarie, individuato nei soggetti affetti da psoriasi, è direttamente in relazione con l'alterazione dell'attività antiossidante e della fluidità delle membrane eritrocitarie (21,22). Il trattamento cutaneo con i fanghi termali solfurei per 12 giorni induce una riduzione dei prodotti di perossidazione lipidica di membrane eritrocitarie provenienti da soggetti affetti da psoriasi, fino a valori non distinguibili, se confrontati con quelli dei controlli costituiti dai soggetti sani (Fig. 3). Tale risultato è in relazione con il recupero della fluidità di membrana, il ripristino ed il miglioramento dei parametri di elasticità e trofismo del derma con riduzione dei processi di desquamazione.

La quota di fitosteroli dosata nei fanghi termali per la sua valenza antinfiammatoria, (1,2,18,19) induce un ripristino delle proprietà delle membrane plasmatiche anche in altri distretti non estesamente esposti ai componenti riducenti contenuti negli estratti (3). Pertanto, sia localmente sia sistemicamente, gli effetti di ripristino della microcircolazione subcutanea sono estesi e consistenti. Ulteriori ricerche sulla microcircolazione di soggetti parimenti trattati e sull'estensione nel tempo dei benefici effetti del trattamento potranno estendere e ribadire la validità dell'ipotesi avanzata.

Bibliografia

1. YASUKAWA K, TAKIDO M, MATSUMOTO T: *Sterol and triterpene derivatives from plant inhibit the effect of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis*. *Oncology* 48(1):72-6, 1991
2. CADEMÁS E, PACKER L, EDS: *Handbook of antioxidant*, Decker M, New York, 1996
3. MAZZULLA S, DE SETA R, BRUNO R, et al.: *Frazione insaponificabile e fitosteroli da matrice organica di fanghi termali: loro potenziale efficacia nella fangoterapia*. *La Clinica Termale* 50:2, 2003
4. FOOTE CS: *Singlet oxygen*. Wassermann H.H. and Murray R.W. Eds., Academic Press, New York; 139, 1979
5. BURTON GW, INGOLD KU: *Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant*. *Science*. 224:569-73, 1984
6. EUN HC, et al: *Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo*. *J Invest Dermatol*, 2001
7. CLEMENS RM, WALLER HD: *Lipid peroxidation in Erythrocytes*. *Chemistry and Physics of lipid* 45:251-268, 1987
8. GUTTERIDGE JMC, HALLIWELL B: *Antioxidants in nutrition, health and disease*. 1st ed. New York. Oxford Univ. Press, 1994
9. MELÉNDEZ-MARTÍNEZ AJ, VICARIO IM, HEREDIA FJ: *Carotenoid pigments: structural and physicochemical considerations* *Arch Latinoam Nutr.* 57(2):109-17, 2007
10. BAUERNFEIND JC: *The safe of vitamin A*. *International Vitamin A Consultive Group*, Nutrition Foundation, Washington DC. USA, 1980

11. VIVANCOS M, MORENO JJ: Beta-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jul 1;39(1):91-7. Epub 2005 Mar 19
12. BOUIC PJD, et al.: *Beta-sitosterol and beta-sitosterol glycoside stimulate human peripheral blood Lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination* *Int J Immunopharmacol* 1996
13. AWAD NE: Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca*. *Phytother Res.* 4(8):641-3, 2000
14. GUPTA MB, NATH R, SRIVASTAVA N, et al. *Anti-inflammatory and antipyretic activities of β -sitosterol*. *Planta Medica* 1980
15. NORME GRASSI e Derivati III. Suppl. *NGD, Riv Ital. Sostanze Grasse*, 44:491-499, 1967
16. ARMUTCU F, COSKUN O, SAHIN S: et al.: Vitamin E protects against acetone-induced oxidative stress in rat red blood cells. *Cell Biology and Toxicology* 21:53-60, 2005
17. PROSERPIO G: *Chimica e tecnica cosmetica*. Ed. Tecnico- Scientifica Sinerga, Milano, 1993
18. MAUVIEL A, DAIREAUX M, HARTMANNI DJ: *Effect of unsaponifiable extract of avocado/soybean (PIAS) on the production of collagen by culture of synovocytes, articular chondrocytes and skin fibroblast*. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.*, 56(2):207-11, 1989
19. MAUVIEL A, LOYAU G, POJOU L JP: *Effect on unsaponifiable extract of avocado and soybean (Piascledine) on the collagenolytic action of culture of human rheumatoid synovocytes and rabbit articular chondrocytes treated with interleukin-1*. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic* 58(4):241-5, 1991
20. BRIGANTI S. PICARDI M: *Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new?* *European Academy of Dermatology and Venereology.* 17: 663-669,2003
21. ROCHA-PEREIRA P, SANTOS-SILVA A, REBELLO I, et al.: *Erythrocyte damage in mild and severe psoriasis*. *Br J Dermatol.* 150(2):232-44, 2004
22. GÓRNICKI A: *Domain structure of erythrocyte membranes in psoriasis: an EPR study*. *J Dermatol Sci.* 29(3):214-221, 2002