

**COMPOSIZIONE DELLA MATRICE ORGANICA DI FANGHI TERMALI:
CONTENUTO DI β -CAROTENE, VITAMINA A, VITAMINA E**

β -carotene, Vitamin A and E the organic matrix of thermal mud

**Università degli Studi della Calabria
Dipartimento di Biologia Cellulare
Laboratorio di Fisiologia Cellulare
Direttore: prof. G. Martino**

S. Mazzulla, M. Menniti, R. Bruno, C. Covello, G. Martino

RIASSUNTO

È noto come la matrice organica presente nei fanghi termali "Maturi" è prodotta dal metabolismo di una microflora, che cresce sul substrato argilloso, a contatto con acque ipertermali solfuree. L'obiettivo di questo lavoro è quello di caratterizzare alcune componenti lipidiche della matrice organica, in particolare β -carotene, vitamina A ed E attraverso tecniche HPLC ed analisi spettrofotometriche. Tali composti possono svolgere una considerevole azione di tipo antiossidante e una attività epitelio riparatrice. La ricchezza di questi componenti in aggiunta alle peculiari attività dei componenti dello zolfo tipici dei fanghi termali solfurei, rivestono grande interesse in applicazioni dermatologiche.

SUMMARY

It is known that the organic matrix from the "mature" thermal mud is produced by the metabolism of micro flora, growing on clay substrate, in intimate contact with hyper thermal sulphur water. The aim of the research is to characterize some lipid components from this organic matrix, particularly β -carotene, Vitamin A and E by HPLC and spectrophotometric analysis. These compounds could act as antioxidants and activators of epithelium repairing activities.

The abundance of these compounds and the characteristic activity of sulphur derivatives in thermal sulphur mud, is of widespread interest in the dermatological field.

INTRODUZIONE

Oggetto del nostro studio è la matrice organica, presente nei fanghi termali di Guardia Piemontese (Acquappesa CS) derivante dal metabolismo della microflora che si accresce sui piani di scorrimento delle acque minerali, classificate come "ipertermali solfuree salso bromo iodiche" (1, 2, 3, 4).

La microflora è costituita da Cianofite (Croccocaceae, Oscillatoriaceae, Nostocaceae) e batteri (Beggiatoa, Thiothrix, Chromatium, Chlorobium) costituenti il "Sulphuretum" (5, 6, 7, 8). La matrice organica rileva una significativa quota di β -carotene, vitamina A ed E, la cui presenza in aggiunta alle peculiari attività dei composti dello zolfo, potenzia l'attività epitelio riparatrice e quindi cheratoplastica sulla cute. La disponibilità di vitamina E riduce l'inattivazione della vitamina A e ne favorisce l'assorbimento, il deposito e la trasformazione (9, 10, 11), mentre i caroteni svolgono un importante ruolo nella protezione delle cellule contro l'ossidazione fotosensibilizzante. La loro azione fotoprotettiva è in relazione con l'attività antiossidante diretta o alla modulazione dei livelli di antiossidanti cellulari derivanti da carotenoidi (12). È noto come le radiazioni UVA diminuiscano i livelli di antiossidanti, ed aumentino la perossidazione lipidica a livello della cute (10, 11). Lo zolfo ed i suoi derivati stimolano la proliferazione dello strato spinoso e favoriscono la cheratinizzazione, mentre i solfuri hanno attività cheratolitica (13, 14). Lo iodio sulla cute e sulle mucose svolge azione revulsiva ed antisettica, la prima va a sommarsi a quella prodotta dall'idrogeno solforato, determinando una quota suppletiva di iperemia cutanea con aumento della microcircolazione cutanea, l'azione antisettica è probabilmente dovuta a processi di inibizione enzimatica, essenziali al metabolismo dei microorganismi (14).

Da quanto detto è evidente la sinergia tra le attività farmacologiche dei composti dello zolfo e la frazione liposolubile nel suo complesso, in particolare delle vitamine A e E e del β -carotene.

Allo scopo di investigare la struttura e la composizione qualitativa di alcuni componenti lipidici estratti dalle matrici organiche dei fanghi termali, sono state utilizzate tecniche cromatografiche ad alte prestazioni (HPLC). Tali tecniche consentono di caratterizzare in modo specifico e capillare la frazione lipidica con particolare riferimento alle vitamine liposolubili.

MATERIALI E METODI

Estrazione di vitamine liposolubili

L'identificazione di vitamine liposolubili, provenienti dalla matrice organica dei fanghi termali, è ottenuta mediante estrazione in fase solida (SPE) (15).

Si utilizza un tubo "Supelclean" con impaccamento C-18 da 100 mg - 1ml. 3,3g esatti del campione, precedentemente disidratato a peso costante, sono risospesi in 6,6 ml di n-esano per spettroscopia (Fluka) ed omogeneizzato a freddo in un apparecchio di Potter-Elvehjem.

Successivamente si condiziona il tubo con due volumi di n-esano e si applica il campione. La frazione vitaminica è recuperata sotto vuoto, essiccata e risospesa in 1 ml di metanolo per HPLC della LAB-SCAN (Dublino - Irlanda). Per la caratterizzazione cromatografica si utilizza un cromatografo liquido ad alte prestazioni "SHIMADZU".

Le condizioni operative sono le seguenti: colonna analitica C18 "Supelchem", 5 μ m, 100 Å, 25 cm per 4,6 mm I.D. flusso 2 ml/min in condizioni isocratiche alla pressione di esercizio 18 Mpa, fase mobile-metanolo/acqua grado HPLC 98:2 (v/v) lettura 290 nm e 325 nm per monitorare rispettivamente il DL-alfa Tocoferolo ed il Retinolo Acetato.

Gli standard utilizzati sono: Retinolo Acetato, DL-alfa Tocoferolo e Colecalciferolo "Supelco" puri per HPLC.

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN CAROTENI

La determinazione del contenuto in caroteni è stata effettuata per spettrofotometria (16).

0,15 grammi della matrice organica presente nei fanghi termali sono sciolti in 5ml di isoottano, reagente "SIGMA" puro al 98% (GC). L'analisi è condotta comparando l'assorbanza specifica a 436 nm, con una curva di taratura ottenuta misurando l'assorbanza di soluzioni a concentrazione nota di β -carotene Tipo I, reagente "SIGMA" puro al 95%.

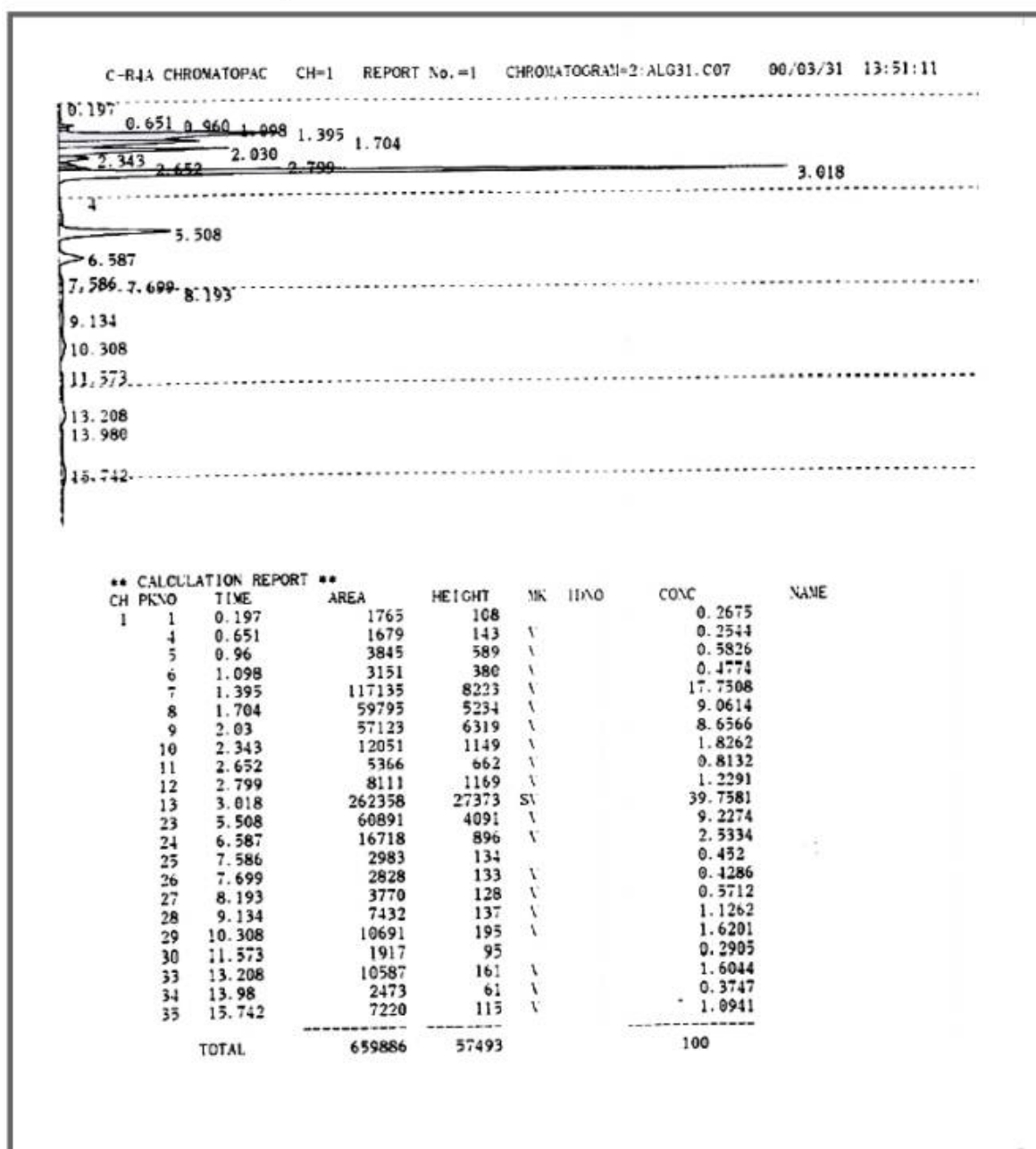
Per le misure è utilizzato uno spettrofotometro "Shimadzu - UV 2100".

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le vitamine liposolubili, estratte da SPE, sono sottoposte ad analisi cromatografiche su HPLC insieme agli standard vitaminici.

Figura 1. CROMATOGRAMMA DELLE VITAMINE STANDARD - RETINOLO ACETATO, COLECALCIFEROLO, DL-ALFA TOCOFEROLO

Fase mobile: Metanolo: Acqua 98:2 (v/v) - Flusso 2ml/min. $\lambda=290$ nm. Volume di iniezione 20 ml



Si procede alle determinazioni analitiche delle vitamine standard precedentemente risospese in metanolo. I risultati ottenuti sono riassunti nel seguente schema.

STANDARD	QUANTITA'	TEMPO DI RIT. (min.)	AREA
Retinolo Acetato	0,87 µg	3,018	262358
Colecaciferolo	0,05 µg	5,508	60891
DL-alfa Tocoferolo	0,125 µg	6,578	16718

L'estratto (SPE) vitaminico della matrice organica dei fanghi termali, [cromatografato](#) alle stesse condizioni degli standard ha dato il seguente risultato.

TEMPO DI RITENZIONE (min.)	AREA
3,242	979050
6,364	8344

L'analisi per confronto dei tempi di ritenzione e delle aree, rispetto ai cromatogrammi standard dà indicazioni sulla presenza di vitamina A e vitamina E nella matrice organica dei fanghi termali.

CARATTERIZZAZIONE QUANTITATIVA DI VITAMINE LIPOSOLUBILI

Considerata la riproducibilità sperimentale dei risultati ottenuti, dopo ripetute analisi di uguali volumi di soluzioni standard e del campione in esame, è possibile determinare la concentrazione dei singoli componenti (17, 18). Dato che i volumi del campione sono identici, le aree dei picchi ottenuti analizzando il campione o le soluzioni standard sono direttamente proporzionali alla quantità del campione in esame, utilizzando l'indice s per la soluzione campione ed st per la soluzione standard, A per l'area del picco e C per la quantità presente si ha: $C_s = A_s/A_{st} \times C_{st}$

I valori ottenuti sono:

$C_s=0,1623 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ di vitamina A

$C_s=0,0032 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ di vitamina E

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL CONTENUTO IN CAROTENI

Per la determinazione quantitativa dei caroteni nella matrice organica dei fanghi termali, si procede realizzando una curva di taratura, sottoponendo al procedimento analitico una serie di diluizioni scalari della

sostanza standard, insieme al bianco (isooctano); si misura l'assorbanza di ciascuna soluzione contro il bianco alla lunghezza d'onda 436nm. La rappresentazione grafica della dipendenza assorbanza/concentrazione permette di affermare che la concentrazione di caroteni nella matrice organica dei fanghi termali è pari a 0,35 µg/µl, pari ad una concentrazione dello 0,035%.

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati illustrati, i livelli di vitamina A, vitamina E, β-carotene nella matrice organica dei fanghi termali si osserva che raggiungono livelli consistenti e talvolta superiori a quelli presenti in altre matrici di origine vegetale. Ad esempio nel caso del β-carotene il contenuto nella matrice esaminata (35mg/100gr di peso fresco) è 30-40 volte superiore a quello di altre fonti abituali, quali carote, agrumi, pomodori che raggiungono un contenuto di 1-6mg/100g di peso fresco. Per quanto riguarda la vitamina A il contenuto nella matrice organica è dell'ordine di 0,0165 g/100g di peso fresco, pari a circa 7 volte il contenuto nei vegetali freschi maggiormente ricchi di questa vitamina quali albicocca, pesca e spinaci (19).

Sulla base di quanto esposto la matrice dei fanghi termali è una fonte rilevante per i principi elencati. In considerazione del fatto che i carotenoidi e la vitamina A possono svolgere una considerevole azione di tipo antiossidante, mediante un meccanismo preventivo, e in considerazione della loro liposolubilità, questo dato indica una notevole potenzialità di tali fanghi come agenti donatori di sostanze protettive sulla cute, inoltre, se si considera che la loro diffusione nell'area subcutanea può raggiungere la microcircolazione cutanea, la loro azione si può esplicitare anche a livello di questa area. Gli agenti descritti svolgono inoltre una azione prevalentemente cheratoplastica sulla cute e la presenza di agenti riducenti, quali i solfuri, consente di ottenere anche una azione cheratolitica per effetto complessivo della componente organica e di quella minerale.

L'insieme dei risultati conferma l'utilità complessiva della componente organica esaminata nel trattamento locale di numerose affezioni e della cute e del circolo cutaneo per cui i fanghi termali studiati possono trovare valida applicazione nella pratica terapeutica dermatologica, sia preventiva che curativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Marotta D., Sica C.: *Composizione e classificazione delle acque minerali italiane. Nota II.* Ann. Chim. Appl., XXIII, 245: 279 e 284, 1933.
2. Federici P.C.: *Le acque salutari della Calabria "Acque del cosentino"*. La Nazionale tip. editrice Parma: 129, 1970.
3. Talenti M., Borgioli M.: *Lo stato del solfo nelle acque di Guardia Piemontese (CS)*, La clinica termale, 6, 1: 3-4., 1953.
4. Vallario A.: *Studio idrologico delle acque termominerali delle Terme Luigiane in provincia di Cosenza.* Boll. Soc. Natur. In: Napoli, LXXXVI/parte I, 149, 1967.
5. Larkin J.M., Strohl W.R.: "*Beggiatoa, Thiotrix and Thioploca*", Ann.Rev. Microbiol. 37: 341-367, 1983.
6. Jorgensen B.B., Revsbech N.P.: "*Colourless sulfur bacteria, Beggiatoa, spp. And Thiovolum spp., in O₂ and H₂S microgradients*" Applied and Environmental Microbiology, 45, 1261-70, 1983.
7. Mazzulla S., De Stefano S.: *Bioglee presente nelle acque ipertermali solfuree salso bromo iodiche delle Terme Luigiane usate nelle terapie ionoforetiche*, Med. clin. term., 39: 63-69, 1977.
8. Kelly D.P.: *Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulphur.* Phi. Trans. R. Soc. Lond. B. 298, 499, 1982.
9. Hiramatsu M., Packer L.: *Antioxidant activity of retinoids.* Methods in Enzymology, 190 part. B, 190, 273-280, 1990.
10. Cademas E., Packer L.: *Handbook of antioxidants.* Dekker M., New York, 1966
11. Ahmad S., Eds: *Oxidative stress and antioxidants defence in biology.* Chapman e Hall, New York, 1996.
12. Burton G.W., IngoldK. U. *Science*, 224, 569, 1984.
13. Messina B., Grossi F.: *Elementi di idrologia medica.* SEU, Roma, 1984.
14. Federici P.C.: *Prolegomeni di chimica e farmacologia idrologica.* Ed. Oppini, Parma, 1979.
15. Macherey N.: *Sample preparation vitamins A, D and E.* LC Department, 111, 1991.
16. Mincione B., Poiana M., Giuffrè A., Modafferi V., Giuffrè F.: *Ricerche sugli oli di oliva monovarietali, Nota Il catterizzazione dell'olio di Peranzana.* La rivista italiana delle sostanze grasse, 61: 549-557, 1984.
17. Snyder L.R., Glajch J., Kikland J.J.: *Pratical HPLC method development.* Wiley interscience. New York, 1988.
18. Yost R.W., Etre L.S., Conlon R.D.: *Introduzione pratica alla cromatografia in fase liquida (HPLC).* Ed. Tecniche Morgan, Milano, 1990.
19. Lentner C.: *Tavole scientifiche Geigy - CIBA-GEIGY Ed., I, 1983.*