

G. NAPPI  
S. DE LUCA  
P. DI BIASE

## Effetto antiossidante dell'acqua minerale "S. Pellegrino"

Antioxidant action of "S. Pellegrino" mineral water

Parole chiave:

**Radicali liberi**  
**Stress ossidativo**  
**Acqua minerale "S. Pellegrino"**  
**Terapia termale**

Key Words:

**Free radicals**  
**Oxidative stress**  
**"S. Pellegrino" mineral water**  
**Spa therapy**

### RIASSUNTO

Per verificare l'eventuale azione antiossidante dell'acqua minerale "S. Pellegrino", 35 pazienti sono stati sottoposti a terapia idropinica per 12 giorni consecutivi.

16 pazienti avevano contemporaneamente effettuato un ciclo di fangobalneoterapia.

I radicali liberi sono stati rilevati, pre e post il ciclo di trattamento, sul sangue capillare intero tramite fotometro FRAS 2.

Lo studio ha evidenziato una riduzione media di radicali liberi del 10,8% ( $P < 0,05$ ) su tutto il campione ed un maggior effetto antiossidante sul gruppo che era stato contemporaneamente sottoposto a fangobalneoterapia (14,2% con  $P < 0,05$ ).

### SUMMARY

*35 patients assumed for 12 days consecutively "S. Pellegrino" mineral water to verify a possible antioxidant action.*

*16 patients received, at the same time, a mud-bath therapy course.*

*Free radicals were detected on capillary-flow before and after therapy by photometric FRAS 2.*

*The study showed an average reduction of 10,8% ( $P < 0,05$ ) of free radicals on all patients; best results (14,2%  $P < 0,05$ ) were obtained on the group who received also mud-bath therapy.*

### PREMESSA

Molte patologie e l'invecchiamento degli esseri viventi sono causati da processi chimici ossidativi.

Questi processi si esplicano quasi esclusivamente tramite la mediazione di molecole altamente reattive dette *radicali liberi*, che nella vita biologica sono rappresentati in preponderanza dai metaboliti reattivi dell'ossigeno.

La presenza di radicali liberi in organismi viventi ha normalmente conseguenze negative, come il danneggiamento diretto o indiretto del DNA e la modificazione strutturale delle proteine.

Inoltre i radicali liberi sono

responsabili dell'innesco del processo di perossidazione lipidica, un processo di natura radicalica a catena che porta al degradamento e alla totale distruzione delle membrane cellulari.

I radicali liberi possono quindi indurre danni anche gravissimi modificando le caratteristiche strutturali e funzionali di un tessuto vivente. Essi sono infatti chiamati in causa nella genesi biochimica di un gran numero di eventi fisiopatologici quali il processo di invecchiamento animale, il processo infiammatorio, il danno ischemico e quello da radiazioni.

La possibilità quindi di misura-

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
Cattedra di Terapia Medica  
e Medicina Termale  
Centro Studi e Ricerche di Medicina  
Termale

Direttore: Prof. G. Nappi

re in forma accurata con un metodo semplice e rapido lo stato ossidativo di un sistema biologico appare di fondamentale importanza per la diagnostica clinica in generale ed indispensabile nel monitoraggio di terapie antiossidanti che sempre più stanno trovando impiego nella pratica medica.

L'oggetto della tesi è la verifica delle potenzialità antiossidanti dell'acqua minerale S. Pellegrino, somministrata principalmente per via idropinica e secondariamente fangobalneoterapica. A tal fine abbiamo determinato lo stato ossidativo del paziente, mediante un sistema relativamente semplice di misura, prima di essere sottoposto alla terapia ed al termine della stessa.

#### I RADICALI LIBERI

I radicali liberi sono una specie chimica (molecola o porzione di molecola) che contengono uno o più elettroni spaiati nell'orbitale esterno.

Questo conferisce loro un'elevata instabilità e reattività in quanto, l'esigenza di restaurare la condizione di equilibrio, comporta la tendenza a ricoppiare il proprio elettrone interagendo con vari tipi di substrati (8).

- *eliminazione dell'elettrone spaiato: azione riducente;*
- *acquisizione di un elettrone: azione ossidante.*

La molecola con la quale ha

interagito il radicale libero diviene a sua volta un radicale libero, tende ad attaccare ulteriori altri substrati, innescando di conseguenza una reazione a catena (19).

I più frequenti radicali liberi sono (19).

- l'anione superossido ( $O_2^-$ ) che ha una vita breve in quanto viene bloccato dalla superossido dismutasi (SOD) che lo trasforma in  $H_2O_2$ .
- l'acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ). È un radicale libero debole che diventa pericolosa combinandosi con l'anione superossido dando origine al radicale ossidrilico. Le catalasi, metabolizzando il radicale superossido prevengono la formazione del radicale ossidrilico.
- il radicale ossidrilico (OH) è il radicale libero più pericoloso e reattivo (8).

Le fonti di radicali libere vengono distinte in:

#### Endogene

- catena di trasporto mitocondriale degli elettroni
- catena di trasporto microsomiale degli elettroni
- enzimi ossidanti
- cellule fagocitarie
- reazioni di autossidazione

#### Esogene

- introduttori di cicli redox (Paraquat, allosano)
- fumo di sigaretta
- alcool
- radiazioni ionizzanti
- shock termico
- esposizione ad inquinanti

- agenti tossici
- farmaci
- eccessiva attività fisica (7, 13, 18, 31, 38).

È importante rilevare che esistono anche cause endogene patologiche come alcune malattie croniche ed i processi infiammatori che comportano aumento dei radicali liberi (30).

Possiamo affermare che l'elevato livello di radicali liberi (stress ossidativo) è, in numerosi casi, sia causa che conseguenza dell'alterazione dello stato di salute.

Tra i bersagli dei radicali liberi abbiamo: lipidi, lipoproteine, proteine, aminoacidi liberi, carboidrati, acidi nucleici, proteoglicani (12, 16, 21, 33, 35). In particolare la rottura dei doppi legami degli acidi grassi polinsaturi delle membrane biologiche conduce ad una progressiva menomazione dell'integrità della membrana con grave sofferenza della cellula (6).

Altri importanti bersagli sono gli acidi nucleici.

Un danno da radicali liberi può verificarsi per deficit di difesa o per aumentata produzione sia per cause endogene che esogene (1, 11, 14, 15, 17, 25, 39). Tra i fattori difensivi distinguiamo fattori enzimologici protettivi e fattori non enzimologici che si oppongono alla loro formazione o attività (tab. 1).

Ricerche relativamente recenti ed in continua evoluzione cor-

relano molte importanti malattie allo stress ossidativo, tra queste (4, 5, 32, 37): tumori, arteriosclerosi, ipertensione, cardiopatia ischemica, vasculopatie cerebrali, demenza di Alzheimer, malattia di Parkinson, cataratta, sterilità maschile, retinite pigmentosa, ecc.

I radicali liberi possono inoltre essere ritenuti responsabili dell'invecchiamento (24, 26) per i danni che provocano sul DNA, sui cromosomi, sui mitocondri e sulle membrane cellulari.

In particolare l'accumulo di radicali liberi ossidanti, conseguente a diminuita attività dei sistemi enzimatici protettivi (20, 34), potrebbe aumentare il livello di errori presenti nelle macromolecole informazionali (DNA).

Tale livello di errori è di fatto una delle espressioni dell'invecchiamento.

#### POSSIBILITÀ DELL'ACQUA S. PELLEGRINO SULLO STRESS OSSIDATIVO

Lo scopo di questa prima fase dello studio è quella di verificare la possibilità che alcune terapie termali possano agire favorevolmente sul livello dei radicali liberi (9, 10, 27).

Non è intenzione ricercarne i meccanismi d'azione tuttavia esistono alcune conoscenze che possono fornire le basi per un eventuale approfondimento dell'argomento.

In relazione ai dati riportati

nella *tabella 2*, estrapolati dalle analisi chimiche e chimico-fisiche, l'acqua S. Pellegrino è classificabile secondo Marotta e Sica e secondo il D. lgs. 105/92 acqua "minerale" (R.F. = 1,074 mg/l), ipotermale (t sorg. = 25 °C).

Premesso che la classificazione di Marotta e Sica è una consuetudine per le acque di uso termale e quella del D.lgs. 105 è regola per le acque minerali

naturali di uso alimentare, in base alla composizione chimica l'acqua in esame può essere denominata nel primo caso "bicarbonato-solfato-alcalino terrosa" e nel secondo solfato-calcica-magnesiaca.

È possibile che l'acqua in esame eserciti un effetto antiossidante per l'azione specifica di alcune sostanze in essa contenute.

Sperimentalmente è stato infat-

Tabella 1. SISTEMI DI DIFESA NEI CONFRONTI DEI RADICALI LIBERI

#### FATTORI ENZIMOLOGICI PROTETTIVI:

- superossidodismutasi
- catalasi
- glutatione perossidasi

#### ANTAGONISTI NON ENZIMOLOGICI DELLA FORMAZIONE O DELL'ATTIVITÀ:

- triptofano
- ascorbato (vitamina C) formato
- istidina
- carotenoidi (vitamina A)
- tocoferoli (vitamina E)
- alcuni sali minerali ed oligoelementi, ecc.

Tabella 2. CARATTERISTICHE SALIENTI DELL'ACQUA MINERALE NATURALE SORGENTE "S. PELLEGRINO"

Temperatura alla sorgente:	25 °C
Concentrazione ioni idrogeno (pH):	7,5
Residuo fisso a 180°C:	1,074 mg/l
lone calcio:	208 mg/l = 10,4 me/l (62% dei cationi)
lone magnesio:	53,5 mg/l = 4,4 me/l (26% dei cationi)
lone solfato:	534,6 mg/l = 10,9 me/l (66% degli anioni)
lone idrogeno carbonato:	222,7 mg/l = 3,6 me/l (22%) degli anioni

Classificazione secondo Marotta e Sica:

*Acqua minerale solfato-bicarbonato-alcalino terrosa ipotermale*

ti accertato che la carenza di magnesio, promuovendo lo stress ossidativo, riveste un ruolo importante nelle patogenesi delle malattie cardiovascolari (23).

Il magnesio ha un ruolo centrale nel metabolismo di proteine, lipidi, acidi nucleici; ha un ruolo nella stabilità delle membrane biologiche, è coinvolto nei fenomeni immunitari ed attiva oltre 300 enzimi (3). Sali di magnesio e di calcio giocano un ruolo protettivo contro il danno ossidativo attraverso l'attività enzimatica delle catalasi, delle glutatione-perossidasi e della superossido dismutasi (3, 22, 29, 36).

Anche alcune azioni aspecifiche delle metodiche termali potrebbero opporsi allo stress ossidativo. Sono di fatto note le azioni antiinfiammatorie delle terapie inalatorie e della fangobalneoterapia.

È stato d'altra parte descritto il ruolo dei radicali dell'ossigeno nella patogenesi del danno tessutale nell'artrosi e nelle patologie croniche delle vie respiratorie.

Secondo alcuni autori la FBT e le terapie inalatorie incrementerebbero le difese antiossidanti ed un decremento della perossidazione da radicali liberi (2). Riguardo alla terapia idropinica, l'assunzione di acqua in eccesso comporta un'espansione dei liquidi del compartimento extracellulare con azio-

ne "lavaggio" e conseguente smaltimento per incremento della diuresi.

#### FASE SPERIMENTALE

Presso le Terme Sanpellegrino, per verificare il ruolo dell'acqua minerale denominata "S. Pellegrino" nel ridurre il livello di radicali liberi nell'organismo umano, è stato selezionato un campione di 35 pazienti. Lo studio assume carattere di preliminarità in quanto ha lo scopo di fornire indicazioni sull'opportunità di proseguire la ricerca in merito.

In questa esperienza pilota abbiamo scelto di concentrare l'attenzione sulla terapia idropinica, metodica che più di ogni altra porta le sostanze delle acque minerali ad interagire direttamente con l'ambiente interno dell'organismo.

#### MATERIALI E METODI

Per l'analisi dei radicali liberi abbiamo utilizzato il fotometro FRAS 2.

Tale apparecchio permette la determinazione rapida dei radicali liberi su sangue intero. Il principio su cui si basa l'analisi è la misura dell'assorbanza, in luce monocromatica, sul contenuto delle cuvette poste nel vano di lettura; una volta rilevata l'assorbanza lo strumento provvede a convertire il risultato nella unità arbitraria Carr.

Il vano di lettura, in alluminio,

è termostato a 37 °C, condizione necessaria per l'effettuazione dell'analisi dei radicali liberi; la reazione, infatti, è di tipo cinetico.

Il test si esegue sul sangue intero capillare.

Data la loro estrema instabilità chimica i ROS formano nel plasma e nelle cellule dei derivati che mantengono comunque un'alta reattività chimica e un buon potere ossidante.

Questi derivati, reagendo con un particolare cromogeno opportunamente tamponato, sviluppano, in una reazione cinetica, un complesso colorato misurabile fotometricamente con un picco massimo di assorbanza a 505 nm e direttamente proporzionale alla loro concentrazione.

#### Interpretazione dei risultati:

- Al di sotto di 250 U. Carr. Valori normali
- Da 250-300 U. Carr. Borderline;
- Da 300-320 U. Carr. Lieve stress ossidativo;
- Da 320-360 U. Carr. Stress ossidativo;
- Da 360-400 U. Carr. Forte stress ossidativo;
- Oltre 400 U. Carr. Fortissimo stress ossidativo.

La procedura corretta che è stata seguita per l'esecuzione del test è la seguente:

- a. massaggiare delicatamente il polpastrello per favorire l'irrorazione sanguigna,

- disinfettarlo con alcool e lasciarlo asciugare;
- b. con l'ausilio di lancette sterili o pungidito, praticare la puntura verso la punta del dito e lievemente di lato;
  - c. eliminare la prima goccia di sangue con un batuffolo di cotone, questa operazione si rende necessaria in quanto la prima goccia di sangue che esce dalla ferita potrebbe contenere troppo liquido cellulare;
  - d. evitando una eccessiva pressione che potrebbe causare emolisi, raccogliere la seconda goccia di sangue con l'apposito capillare da 20 ml riempiendolo completamente;
  - e. togliere la quantità di sangue in eccesso, che eventualmente dovesse essersi depositata sulla parete esterna del capillare, con della carta assorbente;
  - f. prendere la provettina contenente la soluzione tampinata ed inserirvi il capillare contenente il campione di sangue;
  - g. agitare delicatamente più volte per inversione ripetuta, fino a che il colore della soluzione contenuta nel capillare sia diventato uguale a quello del liquido nella provettina;
  - h. travasare il contenuto nella cuvetta vuota in dotazione;
  - i. aggiungere una goccia di Reagente R1 CROMOGE-

NO controllando che la goccia sia regolare e piena e agitare lievemente;

- j. richiudere la cuvetta con l'apposito tappo e posizionarla nell'apposita centrifuga, con uno dei lati zigrinati rivolto verso l'alto e centrifugare per circa un minuto. Assicurarsi che la cuvetta contrappeso sia presente e posizionata correttamente;
- k. a questo punto la cuvetta si definisce "attivata". Si procede inserendo la cuvetta nel vano di lettura. L'apparecchio esegue una prima lettura, dopo 3 minuti dall'inserimento della cuvetta e una seconda lettura dopo altri 3 minuti. Al termine del test il dato viene visualizzato sul display e stampato automaticamente sullo scontrino.

#### FASE DI RECLUTAMENTO ED ESECUZIONE DEL TEST

Portare a termine la ricerca ed ottenere risultati attendibili è stato tutt'altro che semplice.

Le principali cause di interferenza con lo svolgimento del lavoro hanno riguardato:

- 1) L'insorgenza o l'aggravamento, nel corso della cura, di patologie o traumi che potessero innalzare il livello di radicali liberi.
- 2) Le variazioni climatiche, soprattutto il caldo-umido estivo, potenzialmente in grado di elevare lo stress ossidativo.

- 3) Necessità di ulteriore revisione della standardizzazione delle tecniche e della stabilizzazione dei materiali.

Tutto questo ha portato ad essere molto restrittivi riguardo la scelta dei criteri di inclusione. Sono stati inoltre eliminati senza esitazione dallo studio quei casi nei quali ci fosse anche solo il dubbio che si fosse verificato un evento previsto nei "criteri per il drop-out".

Inoltre ogni qual volta i valori sono stati ritenuti troppo differenti da quelli attesi (troppo alti o bassi rispetto al tipo di paziente o di patologia o variazioni esagerate) il test veniva ripetuto con differenti partite di reagenti.

#### *Criteri di inclusione*

I pazienti inclusi nello studio erano portatori di patologie per le quali è indicata la terapia idropinica con acqua S. Pellegrino.

La finalità scelta non è stata quella di comprovare l'efficacia del trattamento su una particolare malattia, bensì di verificarne le potenzialità nel ridurre lo stress ossidativo. Quest'ultimo poteva presumibilmente essere sostenuto parzialmente o totalmente dalla malattia in oggetto, poteva avere anche altre cause.

Dalla *tabella 4* si evince che la maggior parte dei pazienti erano affetti da nefrolitiasi, in atto o pregressa, e da patologie

Tabella 3. STATISTICHE DESCRITTIVE GENERALI

N° CASI		35
ETÀ	media e deviazione standard	61,2 ± 8,9
	mediana	61
	minimo	40
	massimo	79
ETÀ DIMOSTRATA		62,5±8,7 (P<0,05)
SESSO	maschi	23 (65,7%)
	femmine	12 (34,3%)

“croniche” dell’apparato digerente, comprese le epato e colecistopatie.

Più attenzione si è posta ai criteri di inclusione/esclusione e di drop-out.

*Criteri di esclusione*

- Presenza di fattori, non connessi alla patologia in cura, in grado di provocare innalzamento dei radicali liberi: malattie acute o croniche, assunzione di farmaci (es. estrogeni/progestinici), tabagismo, ecc.
- Rischio che nel corso della terapia potessero verificarsi eventi in grado di alterare il livello dei radicali liberi: pazienti soggetti a patologie ricorrenti (molto frequenti le cistiti); pazienti che prospettavano, nel corso del ciclo terapeutico termale, di modificare l’alimentazione, le abitudini di vita o l’assunzione di

farmaci, ecc.

- Affidabilità del paziente nel seguire il protocollo terapeutico: dosaggi, tempi, ritmi, orari, luogo e modalità di assunzione soprattutto in relazione con i pasti ed altre attività.

*Criteri per il drop-out*

- Il paziente non ha eseguito almeno il 90% della terapia.
- Il paziente non si è sottoposto al trattamento standard.
- Il paziente ha eseguito la terapia in modo discontinuo.
- Nel corso del ciclo terapeutico si è verificato un evento, non correlato alla patologia in cura, che può aver causato aumento di radicali liberi: patologie infiammatorie, traumi, assunzione di farmaci, fattori climatici (eccesso di calore ambientale), eccessiva attività fisica, ecc.
- Nel corso della terapia si è

verificato un evento, non correlato alla terapia termale, che può aver causato diminuzione di radicali liberi: assunzione di sostanze antiossidanti, ecc.

Il reclutamento avveniva nel corso della visita di ammissione alle cure termali in base ai criteri di inclusione ed esclusione. Il paziente, prima di iniziare qualsiasi terapia, era indirizzato al medico addetto all’esecuzione del test.

In questa fase veniva compilata un’apposita scheda di ricerca in modo da ricontrollare scrupolosamente la condizione patologica ed i suddetti criteri. Il test era eseguito secondo un prestabilito schema rigidamente standardizzato sulle indicazioni della casa fornitrice dell’apparecchiatura e dei materiali di consumo.

Al dodicesimo giorno del ciclo terapeutico, il paziente, dopo aver assunto le ultime dosi di acqua, si recava dal medico rilevatore.

Per prima cosa veniva sottoposto ad una serie di quesiti al fine di accertare che la terapia fosse stata eseguita correttamente e che non si fossero sovrapposti eventi estranei in grado di causare variazioni in positivo o in negativo della produzione di radicali liberi.

In pratica si controllava che non si fosse verificato uno degli eventi previsti nei criteri per il

drop-out.

Se il paziente risultava attendibile ed idoneo alle finalità dello studio veniva sottoposto al test finale di controllo.

CARATTERISTICHE DEL CAMPIONE

Lo studio condotto è da considerarsi di tipo clinico-osservazionale.

Il campione era costituito da 35 pazienti (N=35) con età media di 61,2±8,9 anni con mediana a 61, il più anziano aveva 79 anni ed il più giovane 40. Tra questi 23 (65,7%) erano maschi e 12 (34,3%) femmine (tab. 3).

Nella raccolta dei dati clinici, data la correlazione tra livello di radicali liberi ed invecchiamento dell'organismo, dal medico ricercatore è stata riportata l'età dimostrata dal paziente; in pratica l'età che soggettivamente veniva presunta in base all'aspetto.

La tabella 3 evidenzia una differenza minima tra le medie dell'età reale e quella presunta (1,3 anni), tuttavia statisticamente significativa.

Questo potrebbe confermare che anche l'aspetto fisico, seppur in piccola parte, risente dello stress ossidativo sostenuto dalle malattie croniche.

Osservando ancora la tabella 4 ci si rende conto che i pazienti erano affetti da una gamma di patologie concomitanti abbastanza vasta. Occorre però rendere noto che nessuna di que-

TABELLA 4. STATISTICHE DESCRITTIVE DEI DATI CLINICI

FREQUENZA DELLE PATOLOGIE IN TERAPIA IDROPINICA	
epatopatia	6
gastro e/o duodenopatia cronica	6
esofagopatia	2
stipsi cronica	4
colecistopatie	2
dispepsia funzionale	2
urolitiasi	12
iperuricemia	3
FREQUENZA DELLE PATOLOGIE CONCOMITANTI	
patologie croniche dell'apparato locomotore	19
ipertensione arteriosa	9
dislipidemia	2
cardiopatie	3
diabete (NIDDM)	2
afezioni croniche delle alte vie respiratorie	7
BPCO	4
flebopatia cronica degli arti inferiori	4
vulvovaginiti ricorrenti	1
adenomioma prostatico	1
ENTITÀ ATTUALE DELLA SINTOMATOLOGIA	
nulla	23
media	11
CONDIZIONI GENERALI	
buone	34
poco compromesse	1
FREQUENZA DELLE ALTRE TERAPIE TERMALI	
fangobalneoterapia	15
fangoterapia	1
massoterapia	6
FKT	1
inalatorie	8
ciclo di cura integrato della ventilazione polmonare controllata (CCIVPC)	2

ste, malgrado l'apparente importanza della denominazione nosologica, era stata ritenuta, in quel momento, in una fase tale da estromettere il caso dallo studio.

Il pericolo maggiore era che la predisposizione a riacutizzazio-

ni di patologie infiammatorie (flebotapie, cistiti, patologie delle vie respiratorie, ecc.) avrebbe potuto causare l'estromissione durante il periodo di cura.

Come già affermato con l'enunciazione dei criteri di esclu-

sione, il rischio è stato ridotto al minimo possibile, anche se, malgrado le precauzioni, qualche problema si è verificato ed ha determinato l'esclusione del paziente dallo studio.

In coerenza con i criteri generali di ammissione alle cure termali, che prevedono l'assenza attuale di quadri clinici gravi o medio-gravi e di condizioni organiche particolarmente compromesse, 23 pazienti presentavano sintomatologia "nulla" e 11 di "intensità media", inoltre le condizioni generali erano buone in 34 casi e poco compromesse in 1.

Particolare attenzione va posta alle terapie termali che i pazienti stavano effettuando in contemporanea a quella idropinica (tab. 4). Sarà importante infatti verificare se altre cure termali possono aver contribuito ai risultati conseguiti. Occorre sicuramente notare, per il momento, che ben 16 pazienti

te 15 ad un ciclo di 12 giorni di fangobalneoterapia ed 1 ad un ciclo di 12 giorni di fangoterapia seguito da doccia di annetamento.

**PROTOCOLLO TERAPEUTICO**

Tutti i pazienti sono stati sottoposti per 12 giorni consecutivi a terapia idropinica alla fonte con acqua minerale naturale S. Pellegrino.

L'acqua veniva assunta in quantità, di giorno in giorno, progressivamente crescenti.

Dopo 3 giorni raggiungevano la quota massima di 2 litri (2.000 ml) che mantenevano fino alla fine del ciclo (vedi schema).

Ogni paziente veniva inoltre informato sulle regole da seguire.

**Orario di assunzione**

L'acqua doveva essere assunta a digiuno, di conseguenza:

- **al mattino:** prima di colazione o circa 2 ore dopo la cola-

Era inoltre consigliabile attendere 30 minuti dal termine della cura prima di assumere cibo od altri liquidi.

**Tempi di assunzione**

Utilizzare bicchieri graduati per poter controllare la quantità assunta.

La quantità di **100 ml** di acqua doveva essere assunta, sorvegliando, in non meno di **5 minuti**.

**Dopo aver assunto 200 ml** di acqua era opportuno fare una **pausa di circa 10 minuti**.

L'acqua doveva essere assunta scrupolosamente alla sorgente per i seguenti motivi:

- Evitare il cambiamento delle caratteristiche chimiche e chimico-fisiche provocate dal trasporto e dalle metodiche di conservazione (es. variazione della temperatura alla sorgente, perdita di gas, ecc.).
- Evitare che fosse assunta in vicinanza dei pasti o, in ogni caso, in contemporanea al cibo.
- Maggior coscienza da parte del paziente e condizionamento da parte dell'ambiente sanitario con conseguente maggior dedizione e scrupolo nel seguire il protocollo.
- Evitare che altre attività (domestiche, svago, attività fisiche, ecc.) portassero il paziente ad assumere l'acqua in maniera distratta senza controllo sui dosaggi e rispet-

SCHEMA DEI DOSAGGI GIORNALIERI DI ACQUA (IN ML)

Giornata di terapia	mattino	pomeriggio	TOTALE
1	600	400	1000
2	1000	500	1500
giorni seguenti	1400	600	2000

erano stati contemporaneamente sottoposti ad un ciclo di fanghi terapeutici; precisamen-

- zione;
- **al pomeriggio:** 4 ore dopo il pranzo.

Tabella 5. RISULTATI

	PRE-TRATTAMENTO	POST-TRATTAMENTO	DIFFERENZA	PERCENTUALE	TEST "t" DI STUDENT
MEDIA ± DS	398,5 ± 106	355,4 ± 87,4	43,1	10,8%	P = 0,007
MEDIANA	388	342	46		
MINIMO	246	214	32		
MASSIMO	734	618	116		

to delle regole.

- La presenza fisica del paziente all'interno del parco della Fonte Termale veniva inoltre regolarmente registrata in modo da avere una ragionevole garanzia che la cura fosse stata realmente effettuata.

Dato che ben 16 pazienti erano contemporaneamente stati sottoposti ad un ciclo di fangobalneoterapia, riteniamo opportuno descriverne le modalità di applicazione.

Il paziente accedeva alla terapia preferibilmente al mattino e comunque a digiuno ultimata.

L'applicazione del fango sulla superficie corporea era affidata a personale esperto che segue le direttive indicate dal medico termale; il fango veniva uniformemente distribuito sulla superficie cutanea della regione o delle regioni da trattare in uno spessore di circa 5-10 cm, alla temperatura di 45-48 °C. Il paziente veniva successivamente ricoperto da lenzuola, telecerate e coperte per ridurre la

dispersione di calore. La durata di ogni applicazione era di 15-20 minuti.

Al termine della seduta il paziente si sottoponeva ad un bagno o doccia di pulizia con acqua minerale, alla temperatura di 37 °C.

Successivamente si trasferiva in una cabina dove, opportunamente coperto, soggiornava per 30 minuti in posizione semisdraiata per la "reazione".

RISULTATI

Pur trattandosi di uno studio preliminare e malgrado le difficoltà sopraggiunte in itinere, i risultati sono confortanti.

La tabella 5 (fig. 2) evidenzia un abbassamento medio di 43,1 U. Carr. che corrispondono ad una riduzione in percentuale del 10,8%, variazione che risulta essere notevolmente significativa al test "t" di Student per dati appaiati.

Abbiamo inoltre voluto dividere il campione in 2 sottogruppi, precisamente costituiti da:

- pazienti che avevano eseguito solo terapia idropinica (N.

19);

- pazienti che oltre la terapia idropinica erano stati sottoposti ad un ciclo di fangobalneoterapia (N. 16).

Questo perché dati della letteratura riportavano che anche solo la fangobalneoterapia potesse essere in grado di ridurre lo stress ossidativo (2). Entrambi i sottogruppi hanno conseguito risultati statisticamente significativi anche se ad una prima visione dei dati (tab. 6 e fig. 3) i pazienti che erano stati sottoposti anche a fangobalneoterapia avevano ottenuto percentuali di miglioramento superiori (14,2% vs 7,4%). Occorre rendere noto che il confronto statistico tra i due gruppi non ha considerato significative le differenze. Potrebbe trattarsi, di conseguenza, di una differenza casuale oppure di una mancanza di dati, vista la ridotta numerosità dei due gruppi.

Annunciamo che altri studi sono in corso per verificare se la fangobalneoterapia sia in

**Tabella 6. CONFRONTO DEI RISULTATI OTTENUTI SUL TOTALE DEI PAZIENTI E SUI SOTTOGRUPPI TRATTATI RISPETTIVAMENTE ESCLUSIVAMENTE CON TERAPIA IDROPINICA E TERAPIA IDROPINICA + FANGOBALNEOTERAPIA**

	NUMEROSITÀ	MEDIA INIZIALE	MEDIA FINALE	DIFFERENZA	t-test per dati appaiati
TOTALE PAZIENTI	35	398,5 ± 106	355,4 ± 87,4	43,1 (10,8%)	P=0,007
SOLO TERAPIA IDROPINICA	19	368,7 ± 65,3	341,5 ± 67,7	27,2 (7,4%)	P=0,0113
TERAPIA IDROPINICA + FANGOBALNEOTERAPIA	16	433,8 ± 131,3	372 ± 103,7	61,8 (14,2%)	P=0,013

grado da sola di ridurre i livelli di radicali liberi. A tutt'oggi i pazienti reclutati sono pochi e non sono rilevabili miglioramenti statistici.

Rimane tuttavia il dato che l'idropinoterapia alla sorgente con acqua minerale S. Pellegrino, eseguita secondo il protocollo applicato nello studio e abbinata o non alla fangobalneoterapia, ha conseguito una riduzione significativa dei radicali liberi.

**CONCLUSIONI**

In questo lavoro abbiamo voluto studiare se l'acqua minerale S. Pellegrino, utilizzata con metodica idropinica e fangobalneoterapica possa svolgere una azione favorente nella

riduzione dei radicali liberi.

Questi prodotti del metabolismo si stanno riconoscendo come implicati nella eziologia di numerose malattie e nei fenomeni di invecchiamento cellulare.

È dunque importante sapere se la crenoterapia possa avere un effetto contrastante l'azione patologica dei radicali liberi, sia perché ciò concorre ad una migliore conoscenza dei meccanismi di azione dell'acqua minerale, sia perché l'indicazione alla terapia termale possa avere ulteriore supporto scientifico.

Noi ci siamo concentrati sull'acqua minerale S. Pellegrino, utilizzata come bibita e tramite la fangobalneoterapia.

In questa ricerca abbiamo osservato un'azione favorente nella riduzione dei radicali liberi da parte dell'acqua in esame, anche se è difficile stabilire quale metodica abbia migliore risultato.

Riteniamo che dall'analisi di questi primi dati si possa trarre una, seppur cauta, soddisfazione perché, nonostante l'esiguità del campione e le caratteristiche "pionieristiche" dello studio, abbiamo documentato un ruolo importante svolto dall'acqua minerale S. Pellegrino nella riduzione dei radicali liberi ed una ulteriore prova del suo ruolo sull'attività favorente lo stato di salute.

Figura 1. RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DEI RIULTATI COMPLESSIVI (P<0,05)

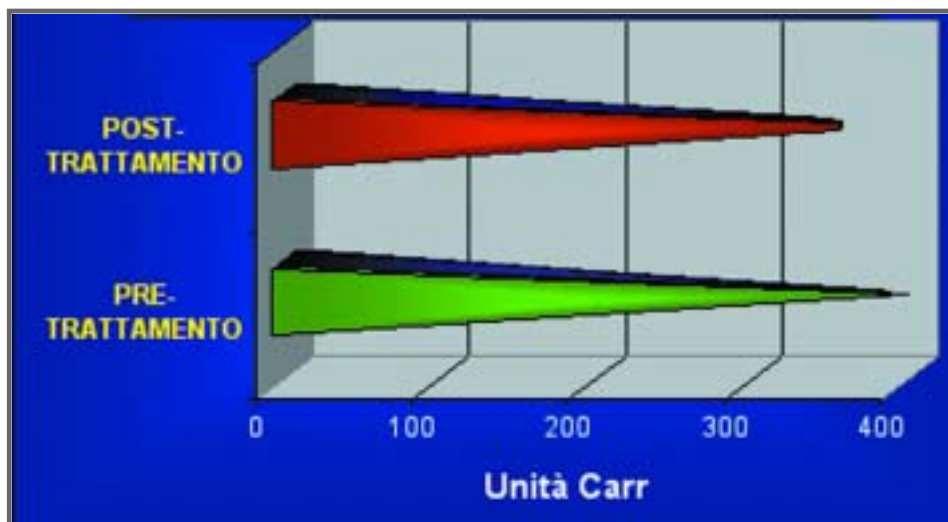
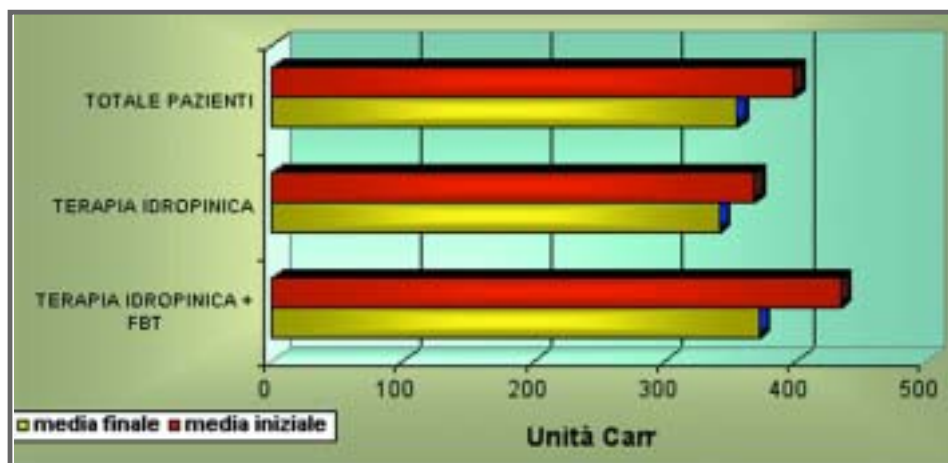


Figura 2. RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DEI RISULTATI OTTENUTI SUDDIVISI PER METODICA



BIBLIOGRAFIA

1. Auts S D e coll.: Role of metals in oxygenradical reaction. *Free radicals Biol. Med.* 1: 3-25, 1985.
2. Belometti S e coll.: Mud pack treatment increases serum antioxidant defenses in osteoarthritis patients. *Biomed & Pharmacother* 1996, 50 (1) p. 37.
3. Bronzetti G: Antimutagenesis studies of magnesium and calcium salts. *J environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19(4): 401-13.
4. Brozmanova J: Repair of oxidative DNA damage: an important factor reducing cancer risk. Minireview. *Neoplasma* 2001; 48(2):85-93.
5. Butterfield D A e coll.: Brain oxidative stress in animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease and Huntington's disease.
6. Chicco D e coll.: Radicali liberi, lipoperossidazione e sistemi di protezione cellulare nel diabete mellito. Atti convegno "Radicali liberi in patologia: nuovi orientamenti patogenetici e strategie terapeutiche". Praga 6-9 dicembre 1990. Ed Momento Medico.
7. Clarkson P M: Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995 Jan; 35(1-2):131-41.
8. Coiro V, Arisi P e coll.: Terapia idropinica con acqua solfurea di Tabiano nell'epatopatia cronica degli alcolisti in fase di astinenza. *Sulphur* 1993; 1:119-128.
9. Coiro V, Vescovi PP: Improvement of haemorrhological alterations in alcoholics by sulfurous water treatment. *Alcolgia* n. 7:27-33, 1995.
10. Coiro V, Volpi R e coll.: Effetto del trattamento idropinico con acqua solfurea della fonte Pergoli di Tabiano nell'epatopatia cronica alcol-correlata. *Med. Clin. Term. N.* 28-29: 107-115, 1994.
11. Coltorti M: Radicali liberi in patologia e possibili meccanismi di protezione. Atti convegno "Radicali liberi in patologia: nuovi orientamenti patogenetici e strategie terapeutiche". Praga 6-9 dicembre 1990. Ed Momento Medico.
12. Demopulos H B: The basis of free radical pathology. *Fed. Proc.*, 32, 1859, 1973.
13. Di Meo S e coll.: Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recepti* 2001 Jan-Apr; 10(1-2):125-40.
14. Dormandy T L: Free radical oxidation and antioxidants. *Lancet* I: 647, 1978.
15. Emanuel M N: Free radicals and the actions of inhibitors of radical processes under pathological states and aging in living organism and man. *Quart. Rev. Biophys.*, 9, 283, 1976.
16. Emerit I e coll.: Chromosome instability in human and murine autoimmune disease: anticlastogenic effect superoxide dismutase. *Acta Physiol. Scand.*, Suppl; 492,49, 1980.
17. Gibson D D e coll.: GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system which protects all membrane. *Lipids* 20:704, 1985.
18. Giuliani A e coll.: Exercise, free radical generation and vitamins. *Eur J Cancer Prev* 1997 Mar; 6 Suppl 1:S55-67.
19. Grassi M e coll.: Tossicosi epatiche, radicali liberi, trattamenti idropinici con acque minerali coleretice. *Clin. Ter.* 46: 31-45, 1993.
20. Guidotti: Le basi patologiche delle malattie. CEA Milano, 1990.

21. Heed K D: Protection of transforming DNA from X-irradiation-induced damage By OH scavenger. *Int. J. Radiat. Biol.*, 36,665, 1979.
22. Ketterer B: Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 16: 957, 1986.
23. Kharb S e coll.: Magnesium deficiency potentiates free radical production associated with myocardial infarction. *J Assoc Physicians India* 2000 May; 48(5): 484-5.
24. Kostka T e coll.: Aging, physical activity and free radicals. *Pol Merkuriusz Lek* 1999 Oct; 7(40):202-4.
25. McCay P B: vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Ann rev. Nutr.* 5: 332, 1985.
26. Mori A e coll. . Oxidative damage in the senescence-accelerated mouse *Ann N Y Acad Sci* 1998 Nov 20; 854:239-50.
27. Nappi G: *Medicina e clinica termale*. 2a ed., Selecta Medica, Pavia, 2001.
28. Niki E: Free radicals in the 1900's: from in Vitro to in Vivo. *Free Radic Res* 2001 Dec; 33(6):693-704.
29. Orrenius S e coll.: The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *Trends Pharm. Sci* 5: 32, 1984.
30. Parsonnet J: Bacterial infection as a cause of cancer. *Environ health Perspect* 1995 Nov; 103 Suppl 8:263-8.
31. Polidori M C e coll.: Physical activity and oxidative stress during aging. *Int J Sports Med* 2000 Apr; 21(3):154-7.
32. Santanam N e coll.: Oxygen radicals, antioxidants, and lipidperoxidation. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16(4): 275-80.
33. Siejo B K e coll.: Neuronal cell damage in the brain: possibile involvement of oxidative mechanisms. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 492,121, 1980.
34. Sikka S C: Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001 Jun; 8(7):851-62.
35. Slater T F: *Free radical mechanisms in tissue injury*. Pion limited; London 1972.
36. Tsan M F e coll.: Enhancements of intracellular glutathione protects endothelial cells against oxidant damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 270, 1985.
37. Tsutsui H e coll.: Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation* 2001 Jul 10;104(2): 134-6.
38. Vina J e coll.: Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 2000 Oct-Nov; 50(4-5):271-7.
39. Winterbourn C C: Protection by ascorbate against acetylphenylhydrazine-induced Heinz body formation in glucose 6p-DH deficient erythrocytes. *Br. J. Haemat.* 41, 245, 1979.