



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA

CORSO DI LAUREA IN FARMACIA

Usi salutistici di *Leontopodium alpinum* (Stella alpina)

Relatore:
Prof. Gianni Sacchetti

Laureanda:
Silvia Rossi

Correlatori:
Dott.ssa Immacolata Maresca
Dott.ssa Silvia Maietti

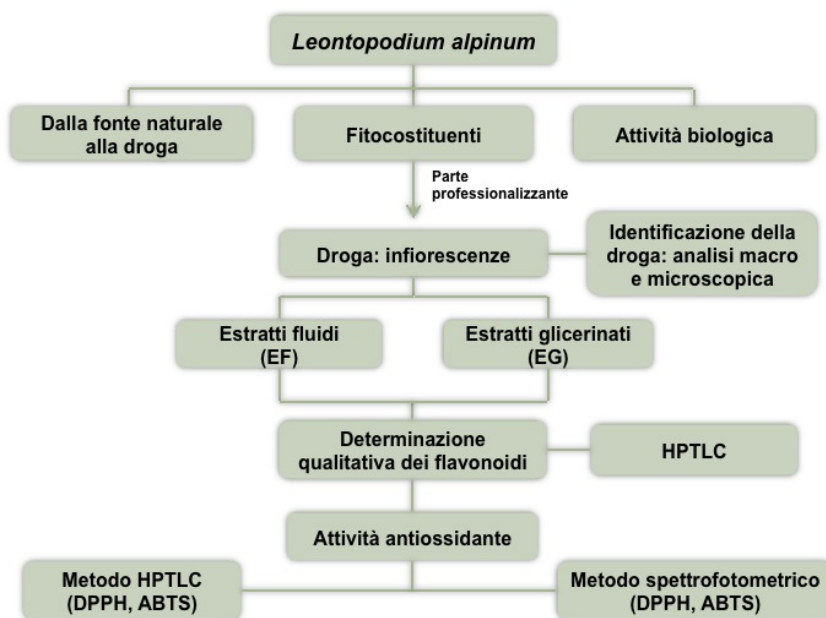
Anno Accademico 2012-2013

INDICE

Riassunto	3
Scopo della tesi	4
Introduzione	5
I. <i>Leontopodium alpinum</i> (Stella alpina) e la flora delle Alpi	5
II. Il clima di montagna e la sua incidenza sulla flora officinale spontanea	6
III. Adattamento delle piante al clima montano.....	8
1. <i>Leontopodium alpinum</i> Cass.	10
1.1 Il genere <i>Leontopodium</i>	10
1.2 Specie: <i>Leontopodium alpinum</i>	12
1.3 Etimologia.....	12
1.4 Classificazione sistematica	12
1.5 Descrizione botanica	13
1.6 Riproduzione	18
1.7 Distribuzione ed habitat.....	19
1.8 <i>Leontopodium alpinum</i> : una specie protetta.....	20
2. Dalla fonte naturale alla droga e ai suoi principi attivi	22
2.1 Coltivazione e produzione di piante officinali.....	22
2.2 Fattori che influenzano la qualità.....	23
2.2.1 Fattori naturali.....	24
2.2.2 Fattori artificiali.....	27
2.3 Dalla droga ai principi attivi.....	29
2.3.1 Preparazione della droga	29
2.3.2 Estrazione.....	30
2.3.3 Torchiatura	32
2.3.4 Concentrazione	32
2.3.5 Controllo di qualità dell'estratto	34

3. I fitcostituenti di <i>Leontopodium alpinum</i>	35
3.1 Vie metaboliche primarie e metaboliti secondari	36
3.2 Le sostanze fenoliche	37
3.2.1 Acidi idrossicinnamici	38
3.2.2 Flavonoidi	39
3.2.3 Lignani	41
3.3 Fitosteroli.....	42
4. L'attività biologica di <i>Leontopodium alpinum</i>	43
4.1 attività antiossidante della Stella alpina	43
4.1.2 L'ossidazione lipidica.....	44
4.1.3 I radicali liberi.....	44
4.1.4 Meccanismo d'azione degli antiossidanti	46
4.1.5 Attività antiossidante dei composti fenolici	46
4.2 Attività chemoprotettiva <i>in vitro</i> degli acidi leontopodici contro l' aflattossina B1	47
4.3 Attività antiinfiammatoria.....	48
4.4 Attività antibatterica	48
4.5 Usi e impieghi della Stella alpina nella medicina tradizionale.....	49
4.6 Stella alpina e il mercato salutistico	50
4.6.1 Formulazione cosmetica contenente <i>Leontopodium alpinum</i>	51
5. Parte professionalizzante	54
5.1 Saggio allo stereomicroscopio.....	56
5.2 Identificazione microscopio ottico.....	58
5.3 Determinazione qualitativa dei flavonoidi mediante HPTLC.....	59
5.3.1 Estrazione in fase solida (SPE)	60
5.3.2 Analisi HPTLC dei flavonoidi	62
5.3.3 Elaborazione dei dati ottenuti dall'analisi HPTLC dei flavonoidi	64
5.4 Valutazione dell'attività antiossidante	65
5.4.1 Metodo spettrofotometrico con DPPH	66
5.4.2 Metodo spettrofotometrico con ABTS.....	67
5.4.3 Metodo HPTLC bioautografico con ABTS e DPPH	69
5.5 Discussione dei risultati	71
Conclusioni	72
Bibliografia	74

Riassunto



Oggetto di questo lavoro di tesi è *Leontopodium alpinum* (Stella alpina). Questa droga è stata inizialmente caratterizzata sotto il profilo botanico - farmacognostico, in seguito sono state analizzate tutte le variabili che possono influenzare la qualità

della droga. E' stata poi effettuata una panoramica sui componenti biologicamente attivi, le proprietà e le indicazioni, sia quelle tradizionalmente note sia quelle supportate da studi scientifici.

Trattandosi di una tesi professionalizzante, è stato inoltre eseguito presso il laboratorio di Biologia Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie (SveB), un controllo d'identità e qualità anatomo-microscopica su un campione costituito da pianta intera essiccata (droga). Successivamente è stata effettuata la valutazione qualitativa dei principi attivi caratterizzanti (flavonoidi) mediante HPTLC e tecnica spettrofotometrica, utilizzando estratti di *Leontopodium alpinum* di diversa modalità e matrice estrattiva, confrontandoli tra loro e con alcuni standard commerciali. Infine è stata quindi valutata l'attività antiossidante attraverso differenti strategie strumentali e bioautografiche. In conclusione, dunque, ho avuto modo di approfondire lo studio di una fonte vegetale ancora poco conosciuta, ma dal grande potenziale utilizzo in prodotti salutistici nuovi ed innovativi e l'esperienza di laboratorio mi ha permesso di conoscere ed utilizzare tecniche di valutazione farmacognostica e di efficacia salutistica operando con strumenti propri della responsabilità professionale del farmacista.

Scopo della tesi

Lo scopo del seguente elaborato di tesi è di ampliare e approfondire le conoscenze su *Leontopodium alpinum* (Stella alpina), risorsa farmacognostica di recente rivalutazione da parte della comunità scientifica, al fine di poterla utilizzare per la formulazione di prodotti ad uso salutistico caratterizzati da attività antiossidante. Pertanto è stata eseguita:

- un'analisi botanica, macro e microscopica sia della pianta intera di *Leontopodium alpinum*, che della droga, rappresentata dalle infiorescenze.
- essendo la Stella alpina una specie floristica protetta e tutelata, e, al tempo stesso fonte erboristica di interesse salutistico, è stato condotto uno studio sulle metodiche di coltivazione, in modo da ottenere una produzione di questa pianta officinale tale da rispettare la natura, ma che garantisca un approvvigionamento di droga costante e con elevati standard quali-quantitativi in principi attivi. È stato inoltre svolto un approfondimento sui fattori naturali ed artificiali che in eguale modo influiscono sulla qualità delle piante officinali.
- la descrizione dei componenti biologicamente attivi che qualificano tale droga, sostenuta in gran parte da ricerche scientifiche ancora in via di approfondimento, delle proiezioni salutistiche moderne, degli usi etnomedici-tradizionali che si sono mantenuti fino al giorno d'oggi.

Infine l'elaborato si conclude con l'esperienza professionalizzante, svolta presso i laboratori di Biologia farmaceutica (Sezione di Botanica Applicata) del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, attraverso la quale è stato possibile effettuare un controllo di identità anatomo-macroscopico e microscopico ed una valutazione qualitativa dei principi attivi caratterizzanti (flavonoidi) mediante HPTLC. E' stata poi effettuata anche una valutazione dell'attività antiossidante ABTS e DPPH sia con metodo spettrofotometrico che con metodo HPTLC bioautografica (Wagner, 2009; Guerrini *et al*, 2011).

INTRODUZIONE

“Una leggenda narra la storia di un giovane che recatosi in montagna a raccogliere erbe e a caccia di marmotte non fece più ritorno a casa; la moglie preoccupata, essendo passati ormai alcuni giorni, si recò alla ricerca del marito. Né ritrovò il corpo esamine tra due lastroni di ghiaccio e non potendo raggiungerlo rimase a piangere sulla sporgenza della roccia sovrastante per tutto il giorno. Quando venne il buio, la giovane non si mosse e continuò il suo pianto per tutta la notte, tanto che la mattina successiva i suoi capelli e le ciglia erano ricoperti di brina, come una peluria argentata. Pregò poi il Signore chiedendo di poter restare per sempre vicino al suo amore e di poterlo vegliare da lassù, non riuscendo ad andargli vicino. Il suo desiderio fu esaudito e fu trasformata nel bel fiore che è il simbolo delle alpi, la Stella alpina”.

I. *Leontopodium alpinum* (Stella alpina) e la flora delle Alpi

La flora alpina comprende tutte le forme di vegetazione che vivono sulle Alpi, compresa la specie *Leontopodium alpinum*. Al fine di comprendere meglio quelle che sono le caratteristiche peculiari della Stella alpina, è importante descrivere quello che oggi è l'habitat di maggior distribuzione di questa pianta e che quindi ha influenzato e influenza il suo sviluppo, la sua crescita nonché il suo tenore quali-quantitativo dei principi attivi. A tale proposito è utile quindi un approfondimento sull'origine della flora alpina.

Le specie vegetali alpine hanno una propria collocazione geografica e sono il risultato di un particolare processo che ha inizio con l'orogenesi alpina, il più recente dei grandi cicli di deformazione della crosta terrestre che ha portato all'insorgere della catena montuosa delle Alpi, formatasi in un periodo dell'ordine del centinaio di milioni di anni, in seguito alla successione di imponenti fenomeni tettonici, stratigrafici e magmatici provocati dallo scontro tra la placca terrestre africana e quella euroasiatica. Tra gli avvenimenti più importanti di quest'ultima parte della storia della Terra, vi sono anche le glaciazioni, cioè periodi climatici freddi durante i quali si ebbe un'avanzamento delle calotte polari che andarono a ricoprire gran parte dell'Europa. Le fasi glaciali, erano caratterizzate dal susseguirsi di un clima freddo causato dall'espansione dei ghiacci (che provocavano modificazioni profonde della morfologia dei territori) a periodi

interglaciali, in cui i ghiacciai si ritiravano anche considerevolmente. Le forti variazioni climatiche, estreme e repentine, connesse alle glaciazioni ebbero quindi sensibili ripercussioni sulla flora e sulla fauna alpina.

Molte specie vegetali, sviluppatesi nei periodi interglaciali e adattatesi a un clima subtropicale (con una temperatura media stimata intorno ai 22°C) si estinsero; altre specie, di fronte alle nuove condizioni ambientali riuscirono a sopravvivere poiché cresciute in aree di rifugio climaticamente favorevoli (come le nicchie esposte a sud) e riuscirono ad evolversi adattando la propria struttura vegetale agli imprevedibili cambiamenti in atto. Probabilmente l'evoluzione è dovuta al verificarsi d'incroci naturali tra individui vegetali geneticamente differenti, che hanno portato alla nascita di una prole ibrida non uniforme. L'ibridazione, infatti, non fornisce caratteristiche stabili e quindi la progenie può presentare attenuazione o scomparsa di caratteristiche non idonee che quindi possono aver reso la pianta resistente alle condizioni ambientali (Bruni, 1999).

Le specie vegetali che possiamo osservare oggi sulle Alpi sono quindi il risultato di un lungo processo evolutivo del sistema floristico che ha saputo rispondere e adattarsi agli innumerevoli cambiamenti geologici e climatici avvenuti nel corso delle ultime ere.

Oltre alle specie paleoendemiche o relittuali¹, che derivano da specie antiche isolate sviluppatesi in loco, alcune nuove specie, le neoendemiche, arrivarono poi da luoghi lontani: è questa l'origine della Stella alpina, le cui specie antenate sono giunte dalle regioni montuose dell'Himalaya durante il susseguirsi dei cambiamenti geologici, insediatesi poi sulle catene montuose alpine, sono state in grado di completare questo lungo processo di adeguamento evolutivo (Reisigl, 1990).

II. Il clima di montagna e la sua incidenza sulla flora officinale spontanea

Le particolari condizioni climatiche delle Alpi, così estreme e selettive, fanno sì che la sopravvivenza della flora sia costantemente messa a dura prova. I fattori che influiscono sulla resistenza delle piante in alta quota, sono:

¹ Paleobotanica: Branca della botanica che si basa sull'interpretazione dei reperti fossili, soprattutto al fine di determinare rapporti tassonomici tra le specie, ricostruzione di habitat e caratteri delle specie estinte. E' fortemente legata allo studio paleontologico (Bruni, 2003).

- **Temperatura dell'aria:** subisce una diminuzione graduale all'aumentare della quota, stimata in un valore medio di $-0,5^{\circ}\text{C}$ ogni 100 metri di dislivello. A questo, si aggiunge la forte escursione termica tra giorno e notte e anche tra una stagione e un'altra.
- **Esposizione dei versanti:** gioca un ruolo prima sull'entità dell'irraggiamento solare (quindi disponibilità di luce e calore per la pianta) e la permanenza della copertura nevosa. E' però opportuno ricordare l'effetto isolante termico della neve, anche se una copertura nevosa troppo prolungata riduce il periodo estivo utile allo sviluppo vegetativo (Reisigl, 1990).
- **Acqua:** per la maggior parte dell'anno si trova allo stato solido, sotto forma di neve o ghiaccio, non è quindi assimilabile dagli apparati radicali delle piante; oppure è persa per infiltrazione o scorrimento a causa delle caratteristiche del suolo (Reisigl, 1990).
- **Umidità atmosferica:** così frequente in montagna per effetto di nuvole o nebbie di condensa. È importante sia perché determina un apporto idrico, seppur limitato, sia perché il vapore permette la rifrazione della luce anche in cavità normalmente poco illuminate.
- **Vento:** è un fattore estremamente limitante in quanto provoca danni meccanici alla vegetazione, accumuli di neve irregolari, e in particolare comporta un'intensa perdita di vapore acqueo dalle piante in seguito a traspirazione. Per contro, al vento è affidata la dispersione dei semi e dei pollini, compito molto importante per la scarsità d'insetti impollinatori.
- **Luce:** è più ricca di raggi ultravioletti e l'intensità aumenta proporzionalmente all'aumentare della quota a causa della maggior rarefazione dell'aria.
- **Suolo:** è spesso assente o grezzo, in genere privo di uno strato di humus; non a caso le piante che vivono sulla roccia sono influenzate biologicamente dalla composizione mineraria della pietra in cui poggiano le loro radici. Inoltre, a causa della bassa temperatura del suolo, l'attività dei microrganismi deputati alla decomposizione della scarsa lettiera vegetale è molto ridotta, pertanto può verificarsi un'insufficiente apporto di sostanze nutrienti fondamentali come l'azoto e il fosforo.

III. Adattamento della flora alpina al clima montano

Per sopravvivere e perpetuarsi in un ambiente così ostile, le piante, nel corso dell'evoluzione, hanno assunto adattamenti morfologici, riproduttivi e fisiologici, specifici e mirati alla difesa dalle condizioni estreme che caratterizzano l'alta montagna, quali:

- **Dimensioni:** la taglia delle piante si riduce man mano che la quota aumenta. Il vantaggio risiede nella capacità di resistere meglio al vento, agli agenti atmosferici e al peso della neve. Il nanismo rende inoltre possibile l'insediamento e lo sviluppo in spazi angusti offerti dalle rocce o dal terreno. Il rimpicciolimento può interessare anche solo alcune parti della pianta: spesso le foglie sono minuscole e coriacee per limitare la perdita di acqua per traspirazione (Reisigl, 1990).
- **Adattamento all'assenza di acqua:** mantenere una riserva idrica è fondamentale in un ambiente, dove essa è scarsamente assimilabile da parte della vegetazione. Alcune specie vegetali tra cui la Stella alpina, hanno sviluppato dei peli protettivi superficiali che formano un sottile strato microclimatico isolante in grado di attenuare la differenza di umidità presente tra l'aria esterna e l'interno della pianta, riducendo così la perdita idrica per traspirazione.
- **Riproduzione:** l'impollinazione, meccanismo scontato nelle pianure è invece molto più difficile in altitudine. Il vento essendo discontinuo e spesso troppo intenso, non è affidabile. Di conseguenza, gli insetti, i quali scarseggiano in questi ambienti, restano il principale veicolo per la riproduzione. Le piante d'alta montagna si adattano a questa mancanza generando fiori particolarmente colorati e di grandi dimensioni, nel chiaro tentativo di attirare quanti più insetti sia possibile. Alcuni tipi di piante ricorrono a metodi alternativi e complementari all'impollinazione per aumentare la probabilità di riproduzione, quali il passaggio dalla fecondazione incrociata all'autofecondazione (Reisigl, 1990), o la produzione di stoloni o bulbilli compiendo così una riproduzione agamica, che si compie senza intervento di cellule sessuate e quindi senza fecondazione (Bruni, 2003). Occorre inoltre accennare che i semi delle piante alpine sono generalmente piccoli e leggeri e spesso dotati di strutture che ne facilitano la dispersione per opera del vento.

- **Ciclo vitale:** in alta montagna diminuiscono le specie annuali, la cui conservazione sarebbe troppo imprevedibile, infatti, a causa del periodo estivo troppo breve, non sono in grado di eseguire l'intero ciclo vitale in un solo anno (germinazione, crescita, fioritura, maturazione del seme e morte). Le piante meglio adattate al clima alpino sono le specie perenni le quali possiedono un apparato radicale che rimane vitale per più anni, ben protetto in inverno dal manto nevoso. Foglie e fusti fioriferi invece, vengono di norma cambiati ogni anno e i loro residui secchi servono spesso a proteggere le gemme situate a livello del terreno che in primavera devono prontamente germogliare. Molte piante si adattano al clima accelerando il processo di fioritura per sfruttare al massimo la breve estate alpina, accade, infatti, che il loro ciclo vegetativo abbia addirittura inizio in inverno. Il manto nevoso mantiene la temperatura del suolo appena sopra lo zero, inoltre il terreno è mantenuto umido dal lento gocciolamento della neve. La neve concede inoltre, a meno che non sia eccezionalmente abbondante, che la luce filtri sino al terreno; si tratta di una illuminazione tenue, diffusa, ma sufficiente a permettere il proseguimento dell'attività fotosintetica. Si può quindi affermare che l'attività di certe piante perenni non subisca una sosta invernale, ma solo un rallentamento di intensità (Reisigl, 1990).
- **Adattamento alla radiazione solare:** le piante d'alta quota hanno imparato a difendersi dalle radiazioni solari sfruttando sia le colorazioni sgargianti dei fiori (i pigmenti colorati hanno, infatti, potere assorbente nei confronti dei raggi ultravioletti nocivi), sia dotandosi di peli protettori, come quelli della Stella alpina, in grado di riflettere la luce (Reisigl, 1990).

CAPITOLO 1

Leontopodium alpinum Cass

1.1 Il genere *Leontopodium*

Leontopodium è un genere di pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Asteracee² o Composite. Il nome del genere (*Leontopodium*) significa letteralmente “piede leonino”, ed è un adattamento latino del greco “leontopódion” (λεοντοπόδιον) da “léon” (= leone) e “pódion” (= piede). Tale nome è stato introdotto nella nomenclatura floristica dal botanico Robert Brown, nella pubblicazione “*Observations on the Natural Family of Plants Called Compositae*” del 1817, facendo riferimento alle brattee lanose e spesso arcuate a falce, che circondano i gruppi dei capolini che furono paragonati agli artigli di una zampa di leone (Peroni, 2012). Il genere *Leontopodium* comprende una trentina di specie che crescono spontanee sugli altopiani desertici dell’Asia (India, Cina e Giappone), sulle pianure steppiche sud-siberiane, sulle Ande, sulle Alpi europee e sugli Appennini (Pignatti, 1982). Tra queste vi sono:

- *Leontopodium alpinum* Cass. (1822) - Stella alpina. Distribuzione: Europa (Fig. 1)
- *Leontopodium nivale* - Stella alpina dell'Appennino. Distribuzione: Italia (Fig. 2)
- *Leontopodium brachyactis* Gand
- *Leontopodium calocephalum* - Distribuzione: Cina (Fig. 3)
- *Leontopodium conglobatum*
- *Leontopodium discolor* - Distribuzione: Asia e Siberia
- *Leontopodium fauriei* - Distribuzione: Giappone
- *Leontopodium haplophyloides* - Distribuzione: Kansu e Szechwan
- *Leontopodium kurilense* - Distribuzione: Asia e Siberia

² Asteracee: denominazione più recente delle Composite, derivata dal genere *Aster* (Bruni, 2003).

- *Leontopodium jacotianum* - Distribuzione: Pakistan, India, Nepal e Cina (Fig. 4)
- *Leontopodium japonicum* - Distribuzione: Cina, Corea e Giappone (Fig. 5)
- *Leontopodium leontopodioides* - Distribuzione: Asia e Siberia (Fig. 6)
- *Leontopodium nanum*
- *Leontopodium ochroleucum* - Distribuzione: Asia e Siberia
- *Leontopodium palibianum*
- *Leontopodium souliei* Beauverd - Distribuzione: Cina
- *Leontopodium stoechas* Hand.-Mazz. - Distribuzione: Cina



Fig. 1- *Leontopodium alpinum* Cass
(de.wikipedia.org)



Fig. 2- *Leontopodium nivale*
(www.actaplantarum.org)



Fig. 3- *Leontopodium calocephalum*
(commons.wikimedia.org)



Fig. 4- *Leontopodium jacotianum*
(fr.wikipedia.org)



Fig. 5- *Leontopodium japonicum*
(www.flickr.com)



Fig. 6- *Leontopodium leontopodioides*
(commons.wikimedia.org)

1.2 Specie: *Leontopodium alpinum*

Leontopodium alpinum (Fig. 1) è la specie più conosciuta e diffusa. Per il suo caratteristico aspetto è divenuto il simbolo delle Alpi. Il termine specifico “*alpinum*” è latino e si riferisce agli areali di crescita della pianta. In realtà tale pianta proviene da zone calde ed aride come è dimostrato dal suo xeromorfismo³. La densa pelosità presente a livello delle foglie e delle brattee, ha una duplice funzione: riparare la pianta dall'eccessiva insolazione e limitare la perdita di acqua per traspirazione. Tale adattamento si riscontra soprattutto in piante di zone aridissime (Pignatti, 1982). Questa modificazione morfologica nasce dall'esigenza di rispondere a condizioni climatiche differenti rispetto a quelle in cui cresce oggi la Stella alpina, ma che consentono di ipotizzare un habitat iniziale tipico di zone aride e ricollegarla ad una sua probabile sviluppo in aree più calde.

1.3 Etimologia

Leontopodium alpinum è la nomenclatura binomiale attualmente accettato ed attribuita alla pianta, più comunemente conosciuta come Stella alpina o Edelweiss. Tale classificazione scientifica è stata proposta dal botanico e naturalista francese Alexandre Henri Gabriel de Cassini (1781 - 1832) in una pubblicazione (“Dictionnaire des Sciences Naturelles”, Strasburgo - Edizione 2) del 1822.

1.4 Classificazione sistematica

La classificazione sistematica della specie può essere riassunta come segue (Tab.1), tenendo presente però, che l'intera sistematica del genere è oggetto di dibattito e attualmente la corretta collocazione della Stella alpina appare sindacabile.

Leontopodium alpinum Cass. è stata originariamente denominata da C. Linneaus come *Gnaphalium leontopodium* L. ed erroneamente posta nel genere *Gnaphalium*, appartenente anch'esso alla Famiglia delle Asteraceae (Cicek, 2011).

³ Xeromorfismo: Possesso di caratteri morfologici classici delle xerofite, che rendono un organismo adattato a sopravvivere in habitat aridi (Musmarra, 1996).

Dominus	<i>Eukaryota</i>
Regnum	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Spermatophyta</i>
Subphylum	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sottoclasse	<i>Asteridae</i>
Ordine	<i>Asterales</i>
Famiglia	<i>Asteraceae</i>
Sottofamiglia	<i>Asteroideae</i>
Genere	<i>Leontopodium</i>
Specie	<i>Leontopodium alpinum</i> Cass

Tabella 1- Classificazione sistematica

1.5 Descrizione botanica



Fig. 7- *Leontopodium alpinum*
(www.dinamic.it)

La Stella alpina (Fig. 7) è una pianta erbacea perenne, eretta, bianco-lanosa, alta 8-15 cm (in natura può arrivare ad un massimo di 30 cm), dall'aspetto cespitoso⁴ e tutta coperta da una fitta peluria bianco-tormentosa, tipica delle zone più alte delle Alpi.

La forma biologica è emicriptofita scaposa, ossia piante perenni con gemme svernanti⁵ che si trovano a livello del suolo, protette generalmente dalla neve, dotate di un asse florale eretto e spesso privo o con poche foglie. Tutta la pianta è lanosa (o tomentosa-fioccosa) per limitare

⁴ Cespitoso: termine riferito al portamento delle piante, anche erbacee, con aspetto di cespuglio (Bruni, 2003).

⁵ Svernante o ibernante: è detto in genere un organismo o un organo che supera l'inverno in condizioni di vita latente. Si può trattare di gemme primaverili che si sviluppano solo nella primavera successiva, rimanendo protette da squame o pèrulle (Sini, 2009).

l'eccessiva traspirazione in quanto è originaria di habitat aridi.

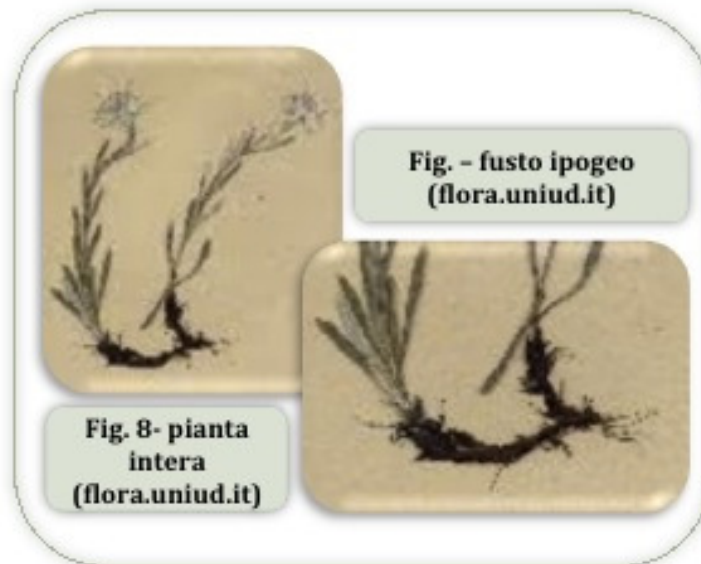
- Radici

Le radici sono secondarie e si originano dal rizoma.

- Fusto

Fusto eretto o ascendente, foglioso e legnoso alla base. Altezza da 10 a 30 cm (Fig. 8)

- Parte ipogea: la parte sotterranea consiste in un rizoma obliquo, breve e di colore bruno. La superficie è divisa da branche squamose (Fig.9).
- Parte epigea: la parte aerea del fusto è ascendente, eretta e semplice con poche foglie. Alla base il fusto può essere legnoso. Tutta la sua superficie è ricoperta da una peluria bianca.



- Foglie

Le foglie sono lineari e lanceolate.

- Foglie radicali (basali): formano una rosetta, hanno una forma oblanceolata e sono più allargate verso l'apice, alterne, intere verdastre o grigio-tormentose, la massima larghezza viene raggiunta a 1/5 dall'apice. Verso il fusto invece si restringono in un breve picciolo. La superficie inferiore è bianco-tomentosa. Da questa rosetta basale possono diramarsi uno o più fusti fioriferi. Per quanto

riguarda le dimensioni delle foglie basali, queste hanno una larghezza di 4 – 6 mm ed una lunghezza di 25 – 40 mm (Fig 10).

- Foglie cauline: Le foglie del fusto sono disposte in modo alterno e sono anche queste intere a forma lanceolata o lineare, ma sessili. Sono simili alle basali ma più strette e lineari. Per quanto riguarda le dimensioni delle foglie cauline o caulinari, queste hanno una larghezza di 2 – 3 mm, ed una lunghezza di 25 – 40 mm (Fig. 11).



Fig. 10- foglie basali
(www.erbe.altervista.org)



Fig. 11- foglie cauline e foglie
fiorali
(www.actaplantarum.org)

- Infiorescenza

Le infiorescenze sono ad ombrella contratta, formate da alcuni capolini (3-7) raccolti in glomeruli⁶ corimbosi⁷ all'apice dei fusti, circondati da alcune brattee (o foglie fiorali) lanceolate, bianco nivee, raggianti, scariose⁸ al margine e lanose. Il capolino centrale è più sviluppato, quasi sessile e più grande, mentre quelli periferici sono brevemente pedunculati. La struttura dei capolini vede esternamente un involucri emisferico o ovoide composto da diverse squame che fanno da protezione al ricettacolo cavo sulla cui superficie esterna s'inseriscono due tipi di fiori: i periferici,

⁶ Glomerulo: gruppo di fiori che nell'insieme formano una palla, quasi sempre costituito da un'infiorescenza con peduncoli fiorali molto brevi (Bruni, 2003).

⁷ Corimbo: tipo di infiorescenza in cui i fiori raggiungono il medesimo livello, mentre i peduncoli si dipartono da altezze diverse dall'asse principale (Bruni, 2003).

⁸ Scariosa: dicesi di squama con consistenza membranosa, non rigida e trasparente (Bruni, 2003).

che sono filiformi e femminili, e i centrali, che sono tubulosi, bianco-giallastri ed ermafroditi, ma maschili per aborto degli organi del gineceo.

L'involucro dell'infiorescenza si compone di 9 – 15 foglie bratteali lanceolate, patenti⁹, disposte a stella, con superficie bianco-lanosa che presentano una lunghezza maggiore rispetto al diametro del glomerulo dei capolini. Questa è la parte più caratteristica della pianta che assolve una funzione vessilifera nei confronti degli insetti impollinatori. Le squame interne dei capolini hanno una forma lanceolato-acuta con apice scarioso ma glabro, la colorazione è ferruginoso-scura. Il diametro del glomerulo è pari a 3 - 6 cm, mentre le dimensioni dell'involucro dei capolini ha una larghezza media di 4 mm ed una lunghezza media di 5 mm.

- Fiore

I fiori sono attinomorfi¹⁰, tetra-ciclici (formati cioè da 4 verticilli: calice – corolla – androceo – gineceo) e pentameri (calice e corolla formati da 5 elementi).

- Calice: i sepali del calice sono ridotti ad una coroncina di squame.
- Corolla: i petali della corolla sono 5, i fiori sono saldati a tubo e terminano in cinque denti. Quelli esterni (femminili) sono lunghi circa 3 mm.
- Androceo: gli stami (circa 5) hanno delle antere acute e caudate alla base (le due code sono lesiniformi), il tutto è saldato insieme e forma una specie di manicotto avvolgente lo stilo. I granuli pollinici possiedono uno strato basale spesso e regolarmente perforato.
- Gineceo: i carpelli sono due e formano un ovario bicarpellare infero uniloculare. Lo stilo è unico con linee stigmatiche marginali, appiattito (senza appendici) e terminante in uno stigma bifido.

⁹ Patente: quando l'elemento considerato (peli, petali, peduncoli) sporge dal fusto ad angolo retto (Treccani).

¹⁰ Attinomorfi: denominazione di un tipo di fiore che può essere diviso in parti uguali per mezzo di vari piani longitudinali. L'equivalente di simmetria raggiata (Bruni, 2003).

- **Fioritura:** da luglio a settembre (Fig. 12, 13, 14).



Fig. 12, 13, 14- infiorescenze di *Leontopodium alpinum* a diversi stadi vegetativi
(www.actaplantarum.org; www.boga.ruhr-unibochum.de; www.actaplantarum.org)

- Frutti

I frutti sono acheni granulosi sormontati da un breve pappo piumoso. Il pappo, di colore paglierino, si differenzia in setole capillari nei fiori femminili e setole clavate¹¹ in quelli maschili. Per quanto riguarda la dimensione dell'achenio questo è circa 1,3 mm mentre la lunghezza del pappo è mediamente di 4 – 6 mm.

- Peli protettori

Leontopodium alpinum ha sviluppato uno strato di peli filamentosi che ricoprono le brattee, circondano le infiorescenze e, con meno intensità, rivestono tutta la parte aerea della pianta.

I peli hanno una duplice funzione:

- Proteggono la Stella alpina dalla disidratazione creando un sottile strato isolante in grado di attenuare la differenza di umidità presente tra l'aria esterna e l'interno della pianta;
- La riparano dalle radiazioni ultraviolette, mediante assorbimento delle stesse all'interno dello strato lanoso superficiale che scherma il tessuto cellulare più interno evitandone il danneggiamento.

Queste caratteristiche morfologiche, che rendono la Stella alpina pianta particolarmente evoluta rispetto all'adattamento in ambienti freddi e caratterizzati da elevata insolazione, hanno riscosso particolare interesse presso la comunità scientifica. Recenti studi, infatti, hanno messo in luce che ognuno di questi filamenti di *Leontopodium*

¹¹ Clavato: termine riferentesi ad organo a forma di clava (Bruni, 2003).

alpinum, possiede una struttura fotonica¹² naturale (Fig. 15, 16), piuttosto rara per il mondo vegetale, le cui proprietà ottiche possono influenzare la riflettanza e trasmittanza UV dello strato di pelo che ricopre la brattea. Questa struttura nella pianta serve al controllo dello scambio di energia termica, funzione che potrebbe essere di larga applicazione nel settore cosmetico per la progettazione di filtri solari ed ingegneristico per lo sviluppo di materiali con tale attività (Vigneron, 2008).

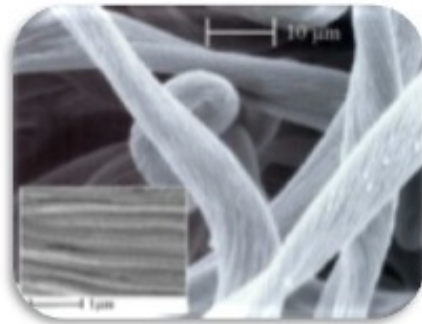


Fig. 15- immagine dei filamenti di *Leontopodium alpinum* ottenuta con microscopio elettronico a scansione. Si noti la struttura submicronica dei peli (riquadro); (Vigneron, 2008).

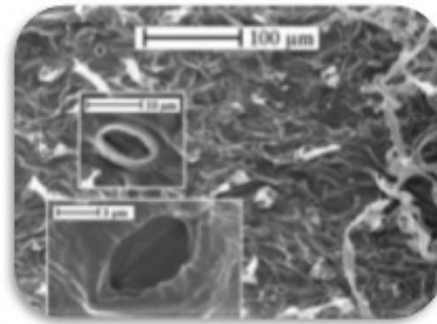


Fig. 16- immagine dei filamenti di *Leontopodium alpinum* ottenuta con microscopio elettronico a scansione. Si noti la sezione trasversale del pelo protettore che è cavo e di sezione non costante per tutta la lunghezza (Vigneron, 2008).

1.6 Riproduzione

La riproduzione della Stella alpina è sessuale e si sviluppa principalmente in 3 fasi importanti:

- Impollinazione: di tipo entomogama, ovvero mediata da insetti.
- Fecondazione: che avviene tramite l'impollinazione dei fiori in seguito a deposizione del polline sugli stimmi florali dove, con l'emissione del budello pollinico, giunge a fecondare gli ovuli contenuti nell'ovario.
- Dispersione: si sviluppa in più modi. I semi, dopo essere stati trasportati per alcuni metri dal vento per merito del pappo, cadono a terra (disseminazione

¹² In una struttura fotonica, una successione periodica di dielettrici con diverso indice di rifrazione preclude il libero attraversamento del mezzo a tutti quei fotoni confinati dentro determinati intervalli di frequenze, quindi tali fotoni non potranno superare la struttura e saranno riflessi o assorbiti all'interno dello strato di peli.

animocora) e poi successivamente dispersi, soprattutto da insetti tipo formiche (disseminazione mirmecoria).

1.7 Distribuzione ed habitat

La Stella alpina cresce nelle zone più alte delle Alpi, principalmente su terreni calcarei, ben drenati e con pH basico. La sua origine tuttavia non è alpina ma probabilmente orientale: fu trasportata sulle Alpi da avvenimenti geologici di varia entità e natura (Bruni, 2003). In realtà quindi, la Stella alpina, divenuta simbolo della natura alpina, è una pianta proveniente dalle regioni calde e aride degli altopiani desertici dell'Asia Centrale (altre specie del genere *Leontopodium* si trovano in queste zone). Il collegamento con le specie asiatiche è dimostrato ampiamente da diversi studi fatti sul genere *Leontopodium* dai quali risultano i stretti rapporti filogenetici di parentela con le specie asiatiche pur considerando la notevole disgiunzione geografica tra i due areali. Segno evidente della sua precedente appartenenza ad aree calde è la presenza di peli protettori, che non serve a proteggerla dal freddo, ma dall'eccessiva perdita d'acqua (Peroni, 2012). Pignatti colloca la sua comparsa in Europa in epoca relativamente recente, probabilmente durante le glaciazioni. Questa si è quindi insediata sulle pendici erbose rivolte a meridione, che ancora oggi rappresentano le condizioni migliori di

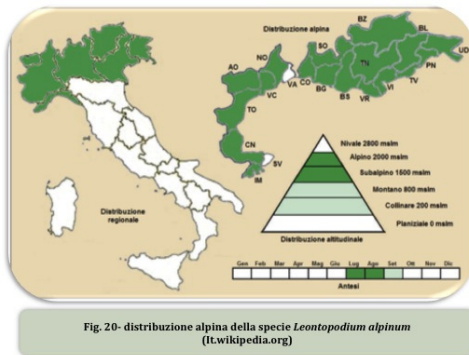


Fig. 17- habitat *Leontopodium alpinum*
(www.claudiopia.it)



Fig. 18, 19- *Leontopodium alpinum* su roccia
(thebiggestplantdictionary.blogspot.com;
www.summitpost.org)

habitat della pianta (Fig. 17). La credenza che le Stelle alpine crescano solo sulle rocce più impervie è quindi non solo pericolosa, convinzione che è costata decine di incidenti mortali, ma anche sbagliata scientificamente. Le Stelle alpine su roccia sono rare e per lo più limitate a rocce friabili, spesso però di particolare bellezza potendo svilupparsi senza concorrenza (Fig. 18; 19). Essa, dice Pignatti, è frequente sulle Prealpi Venete fra i 1300 e 1600 metri.



La specie *Leontopodium alpinum* è presente nelle Alpi francesi, svizzere, austriache e slovene. Sugli altri rilievi montuosi europei si trova nel Massiccio del Giura, Pirenei, Alpi Dinariche, Monti Balcani e Carpazi. In Italia questa specie è presente solamente nelle Alpi (occidentali, centrali ed orientali), la si può trovare nei pascoli seslerieto-sempervireti, ma anche in luoghi rupestri, da 1500 fino a 2600 metri (Fig. 20.)

1.8 *Leontopodium alpinum*: una specie protetta

Appartengono alla categoria delle specie rare tutte quelle specie che, per la loro limitata diffusione naturale o per contrazione del loro areale di diffusione o per cause antropiche (mutamenti delle condizioni climatiche, indiscriminato prelievo, sottrazione di habitat) sono poco diffuse in senso assoluto sul pianeta o relativamente a determinati areali, che rappresentano settori disgiunti dell'areale principale.

Le ragioni quindi, che devono indurre la comunità a difendere la flora spontanea sono di varia natura:

- Ragioni ecologiche: possibilità di rottura di equilibri naturali, difesa del suolo. Occorre inoltre ricordare come le specie rare, proprio in quanto tali e in quanto estremamente esigenti dal punto di vista delle condizioni ambientali, siano da considerarsi degli indicatori dello stato di salute di ambienti anch'essi rari o addirittura esclusivi e riflettano indirettamente la biodiversità di un ecosistema.

- Ragioni scientifiche: menomazione del patrimonio naturalistico con possibilità di conseguenze negative anche gravi per la ricerca di base, quella applicata e la biodiversità;
- Ragioni economiche: per la menomazione delle attrattive turistiche.

Se tali considerazioni sono estendibili a tutta la nostra flora spontanea, a maggior ragione lo sono nei confronti delle specie più rare e preziose. (Peyronel, 1973).

La presa di coscienza dell'importanza della tutela ambientale spinge la comunità scientifica a stilare elenchi contenenti le specie rare, minacciate, estinte o che corrono il rischio dell'estinzione. Ferme restando le competenze riservate allo Stato in materia di tutela dell'ambiente e dell'ecosistema, le Regioni, in questo caso quelle dell'arco Alpino, disciplinano con la presente legge regionale 2 novembre 1982 n.32 e successive modificazioni, le norme per la conservazione del patrimonio naturale e dell'assetto ambientale, in particolare, l'articolo 15 sulla protezione della flora, cita: "sono vietate la raccolta, l'asportazione, il danneggiamento, la detenzione di parti, nonché il commercio tanto allo stato fresco che secco delle specie vegetali a protezione assoluta di cui all'elenco allegato che fa parte integrante della presente legge".

Leontopodium alpinum è protetta ai sensi della L.R. n.33/77 (provvedimenti in materia di tutela ambientale ed ecologica), inserita nelle Liste Rosse Regionali (LR - a minor rischio) e Nazionali (VU - vulnerabile) 1997, poiché considerata specie esposta a un alto rischio di estinzione in natura.

CAPITOLO 2

Dalla fonte naturale alla droga e ai suoi principi attivi

La Stella alpina oggi è una specie floristica protetta e tutelata da precise leggi regionali che non consentono di cogliere la pianta spontanea presente in natura. Tali disposizioni legislative si sono rese indispensabili per preservare la specie dall'estinzione. Rischio corso a causa della smodata raccolta che, negli anni, ha determinato un depauperamento significativo di questa pianta la quale presenta inoltre un'areale limitato, altra caratteristica che ha inciso ulteriormente in quello che è stato il rischio della sua scomparsa totale.

Attualmente importante ed indispensabile risulta quindi la sua coltivazione che ne rende possibile il suo utilizzo sia a scopo ornamentale sia a scopo salutistico visto il crescente interesse che i settori erboristico e cosmetico mostrano nei confronti delle proprietà manifestate dalla Stella alpina.

2.1 Coltivazione e produzione di piante officinali

La coltivazione di piante officinali può portare a diversi miglioramenti rispetto alla raccolta di piante spontanee:

- Possibilità di produrre da specie, varietà o ibridi con caratteristiche prestabilite;
- Miglioramento genetico attraverso selezione e clonazione;
- Prodotto di qualità uniforme, quindi standardizzazione a livello di principi attivi mediamente contenuti;
- Miglioramento dello sviluppo della pianta per le più favorevoli condizioni del suolo, della maturazione, del controllo fitosanitario;
- Possibilità di abbondante approvvigionamento;
- Miglioramento del trattamento post-raccolta e qualità della droga mantenuta per tempi più lunghi.

Tali presupposti devono essere perseguiti non tanto per assicurarsi raccolti sempre più abbondanti ma soprattutto per produrre raccolti di qualità costante ed uniforme.

Nel momento in cui ci si appropria a una specie officinale fino a quel momento poco o per nulla coltivata, come nel caso specifico del *Leontopodium alpinum*, importante è :

- L'identificazione e lo studio delle condizioni di sviluppo nell'ambiente dove tale pianta cresce spontanea, unitamente alla considerazione di quanto piccoli mutamenti ecologici possano influire in modo rilevante sulla qualità e quantità della droga. Quindi è necessario porre molta attenzione allo studio delle relazioni ambiente-qualità ed ambiente-quantità per stabilire i possibili areali di coltivazione.
- L'individuazione di genotipi¹³ ricchi in principi attivi da utilizzare nel lavoro di miglioramento genetico e/o l'individuazione di genotipi dotati di un principio attivo prevalente o privi di altri che ne complichino i metodi di estrazione ed isolamento.
- Lo studio delle relazioni che intercorrono tra il tipo di tecnica-agronomica adottata (es. giuste concimazioni) e il rapporto qualità/quantità di principi attivi ottenuti. Questo consente l'individuazione del miglior metodo di coltivazione.
- L'individuazione dei chemiotipi¹⁴ per una migliore classificazione delle specie.

2.2. Fattori che influenzano la qualità

Le piante compiono il loro ciclo vitale in stretta relazione con l'habitat e la stessa presenza di principi attivi può essere influenzata dalle condizioni di vita o di coltivazione della pianta stessa (Bruni, 1999).

Le conseguenti variazioni in principi attivi sono influenzate da:

- Fattori naturali (endogeni, esogeni) (Fig. 20.)
- Fattori artificiali (raccolta, preparazione, conservazione, alterazioni spontanee, enzimatiche, dovute all'invecchiamento.)

¹³ Genotipo: complesso dei caratteri genetici di un individuo, cioè di quelli che esso è capace di trasmettere ai suoi discendenti. Costituisce, quindi, l'insieme delle caratteristiche genetiche di un individuo, che possono o meno esprimersi in caratteristiche osservabili (fenotipo) a seconda della "pressione" esercitata dall'ambiente (Bruni, 2003).

¹⁴ Chemiotipo: In funzione a diversi fattori ambientali (sole, clima, composizione del terreno, altezza sul livello del mare ...), una stessa pianta può secernere delle essenze molto diverse. Queste variazioni biochimiche nella composizione degli oli essenziali portano alla creazione del concetto di chemiotipo (Bruni, 2003).

2.2.1 Fattori naturali

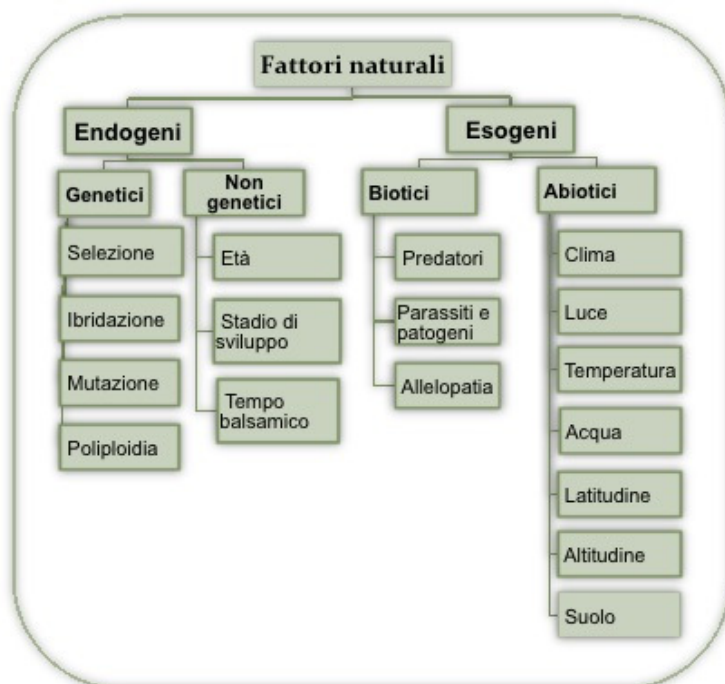


Fig.21 - fattori naturali che influenzano la qualità della droga e delle piante medicinali

Fattori naturali endogeni genetici

Tra tali fattori, la selezione, cioè l'identificazione delle specie vegetali di maggior interesse, e l'ibridazione, che consiste nell'incrocio d'individui geneticamente diversi per produrre una progenie ibrida, sono fondamentali nel determinare caratteri biochimici e morfologici particolarmente desiderabili per l'utilizzo delle piante medicinali. È quindi possibile ottenere grandi variazioni quali-quantitative nella composizione dei principi attivi e, quindi, nella qualità della droga (Bruni, 1999). Proprio per questo scopo, è stata creata il cultivar *Leontopodium alpinum* "Helvetia" un ibrido che si distingue e garantisce un elevato tenore in principi attivi, in particolare in acidi leontopodici, molecole che caratterizzano la droga e il suo profilo biologico (Vouillamoz, 2008); è inoltre possibile ottenere cultivar apprezzabili da un punto di vista più pratico, che nel caso della Stella alpina presentano una lunghezza maggiore degli steli fiorali per facilitare la raccolta a mano delle sommità fiorite e infiorescenze più grandi.

Fattori naturali endogeni non genetici

- Età e stadio di sviluppo: La qualità e la quantità dei principi attivi nella pianta può variare in relazione al ciclo vegetativo (sviluppo o quiescenza) e al ciclo vitale (giovanile, maturo o senescente). Tale fattore quindi si basa su variazioni nella qualità o quantità dei principi attivi in base allo stato vitale (Bruni, 1999).
- Tempo balsamico: corrisponde ad un determinato stadio di sviluppo della pianta, che è diverso da specie a specie. È il periodo in cui verrà effettuata la raccolta della pianta in quando il tenere in principi attivi sarà massimo. Questo fattore è particolarmente importante per la determinazione del valore commerciale e del corretto impiego della droga.

Nel caso specifico, la Stella alpina è una pianta perenne. La droga è rappresentata dalle sommità fiorite, che sono quindi raccolte a sviluppo completo e in piena fioritura, nel periodo compreso tra metà giugno e fine settembre.

Fattori naturali esogeni biotici

Tra tali fattori, la lotta contro parassiti e patogeni è fondamentale per lo sviluppo del normale ciclo vegetativo della pianta. I parassiti e gli organismi patogeni, infatti, vivono a spese della Stella alpina condizionandone lo sviluppo e lo stato di salute, finendo per causarne la morte. Si parla più correttamente d'infestazione parassitaria riguardo all'attacco di animali pluricellulari (insetti, etc.) e d'infezione patogena da parte di microrganismi (batteri, funghi e protozoi).

Fattori naturali esogeni abiotici

Questi fattori sono di particolare importanza poiché regolano lo sviluppo della pianta e di conseguenza anche la composizione quali-quantitativa dei metaboliti primari e secondari. Per questo motivo, infatti, spesso piante officinali portate in habitat diverso da quello naturale non hanno la resa prevista. Per una corretta coltivazione di specie vegetali destinate all'utilizzo salutistico, è strettamente necessario ricreare quelle che sono le condizioni ambientali che più ricalcano il contesto naturale di crescita spontanea.

La Stella alpina è una pianta che trova il suo ambiente ideale sui pascoli soleggiate di altitudine (praterie rase alpine e subalpine), ma anche in luoghi rocciosi e pendii franosi (ghiaioni alpini), è pertanto coltivata all'interno di realtà montane (se posta in pianura, la pianta perde la sua caratteristica peluria ed assume modificazioni morfologiche, come

l'allungamento eccessivo dei fusti, per potersi adattare e sopravvivere in condizioni sfavorevoli; ovviamente ciò influisce negativamente sulla produzione di principi attivi).

Importante per lo sviluppo delle specie vegetali è la composizione del suolo perché esso rappresenta il sostegno fisico, dà rifornimento di nutrienti (è il substrato nutritivo principale), d'acqua e di gas per il sistema radicale; quindi anche la sua tessitura e le caratteristiche chimico-fisiche dovranno avere requisiti particolari.

La Stella alpina predilige substrati calcarei con pH basico e bassi valori nutrizionali del terreno che deve essere secco. Per tale motivo, la sua coltivazione avviene utilizzando dei fertilizzanti correttori di pH (quali carbonati di calcio) che sono addizionati al terreno circa due volte l'anno, a maggio e a fine agosto, poiché le piogge, dilavando il terreno provocano un'alterazione del pH. Importante quindi è il monitoraggio, attraverso il controllo della presenza di eventuali piante clorotiche, e la possibile correzione. La pianta clorotica¹⁵ presenta un'alterazione a livello della colorazione soprattutto per quanto riguarda le foglie che si presentano inoltre di dimensioni più ridotte e soggette ad anticipata caduta.

La Stella alpina richiede un minimo apporto d'acqua, di conseguenza, le innaffiature dovranno essere regolari, ma poco abbondanti per evitare la formazione di ristagni d'acqua che potrebbero causare marciumi radicali, è inoltre importante ricordare che la funzione dei peli è anche quella di proteggere la pianta da eccessiva disidratazione, funzione fisiologica che se abbinata a un'eccedenza d'acqua nel suolo può essere fatale.

La disponibilità e l'intensità della luce sono fattori essenziali poiché da essa dipende il processo della fotosintesi che consente alla pianta di nutrirsi. Importante poi è anche la qualità e la durata delle ore di luce giornaliera, ovvero il fotoperiodo. La Stella alpina è una pianta longigiurna in quanto fiorisce da luglio a settembre, ovvero quando il periodo del giorno è maggiore rispetto a quello della notte. Il fitocromo, pigmento accessorio in grado di percepire le variazioni di luce, determina l'attivazione stessa di metaboliti secondari e può essere responsabile della produzione di principi attivi. La luce è quindi un fattore limitante soprattutto per gli organismi autotrofi¹⁶. Anche la temperatura determina notevoli variazioni nel tenore del metabolismo e quindi nel contenuto in principi attivi. Infatti, i vari metaboliti secondari delle piante sono il risultato di una

¹⁵ Clorosi: Processo di ingiallimento causato dalla mancanza o dalla demolizione della clorofilla in una pianta superiore (Bruni, 2003).

¹⁶ Autotrofo: organismo capace di sintetizzare le sostanze organiche che gli sono necessarie a partire da sostanze inorganiche (Bruni, 2003).

sequenza di passaggi biochimici ciascuno dei quali ha una temperatura ottimale (Azienda Agricola Priola, www.vivaipriola.it)

2.2.2 Fattori artificiali

La qualità delle piante officinali destinate al mercato salutistico non si ottiene solo durante la coltivazione, ma anche, e soprattutto, si sostanzia nelle procedure che sono messe in atto durante la raccolta e nelle fasi successive (Bruni, 1999).

I criteri e le modalità di raccolta variano a seconda del tipo di pianta e dei principi attivi, sempre tenendo conto del tempo balsamico.

La FUI riporta le seguenti regole secondo la parte da raccogliere:

Foglie	A completo sviluppo
Radici e rizomi	Durante la fase di quiescenza vegetazionale
Cortecce e legni	A completo sviluppo della pianta
Fiori	Ad antesi completa ed al sorgere del sole
Frutti e semi	A maturità

Tabella 2 – Criteri di raccolta secondo le indicazioni riportate in FUI

La filiera produttiva della post-raccolta comprende i fattori artificiali (schematizzati e riportati in figura 22) messi in atto al fine di impedire le alterazioni che portano a variazioni delle caratteristiche chimico-fisiche, organolettiche e del contenuto in principi attivi della droga, mantenendo così elevati standard di qualità e sicurezza della specie officinale trattata.

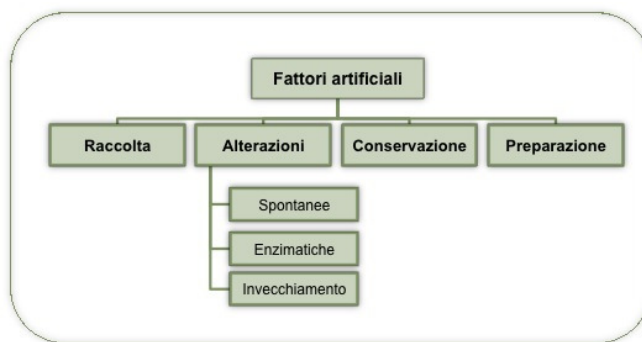
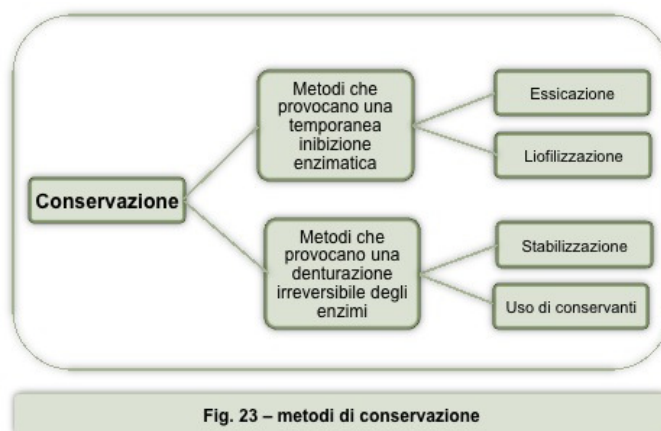


Fig. 22- fattori artificiali che influenzano la qualità delle piante medicinali

Le variazioni riportate dalla droga, costituita nel caso della Stella alpina dalle sommità fiorite, possono essere spontanee, enzimatiche o in conseguenza all'invecchiamento del materiale vegetale. Al fine di limitare il più possibile l'eventuale insorgenza di trasformazioni non desiderate, è opportuno che la droga, una volta raccolta, possa giungere entro le 24 ore successive, nell'azienda di trasformazione dove verranno messe in atto idonee strategie di conservazione mirate soprattutto all'allontanamento dell'acqua libera contenuta nella pianta e di conseguenza alla inibizione dell'attività enzimatica degradativa (figura 23).



Si riporta di seguito una tabella (Tab. 3) che riassume i diversi fattori che influenzano le qualità della Stella alpina.

STELLA ALPINA	
Droga	Sommità fiorite
Tempo balsamico	Da metà giugno a fine settembre
Fotoperiodo	Longidiurna
Luce	Esposta al sole
Temperatura	Annuale diurna media: da - 4° a 25° Annuale notturna media: da - 8° a 13°
Acqua	Ridotto apporto idrico
Altitudine	1300 metri
Latitudine	Area alpina
Suolo	Terreno calcareo a pH basico
Tab. 3- fattori naturali ed artificiali che influenzano la qualità della Stella alpina.	

2.3 Dalla droga ai principi attivi

I processi di trasformazione della droga e di estrazione dei principi attivi sono effettuati con metodi e apparecchiature, molto diversi tra loro a seconda del tipo e della quantità di estratti da produrre, della diversa qualità delle droghe trattate e del tipo di solventi impiegati. Importante quindi, ai fini di ottenere un buon estratto, è l'identificazione del tipo di pianta da trattare, lo studio delle caratteristiche chimico-fisiche del suo fitocomplesso e\o della parte che di esso si vuole isolare durante i processi estrattivi, la termosensibilità del principio stesso e il solvente che consentirà la separazione di tali principi attivi dal materiale vegetale che li contiene.

2.3.1 Preparazione della droga

Le sommità fiorite della Stella alpina, giungono fresche all'azienda deputata alla sua lavorazione, qui la droga è identificata, classificata, pesata e quindi preparata per i diversi processi di trasformazione nelle ventiquattro ore successive alla sua raccolta, secondo lo schema riportato in figura 24.



Prima di iniziare le operazioni di lavorazione della pianta è opportuno eseguire un controllo di qualità che include l'analisi dell'identità della droga attraverso il riconoscimento visivo della stessa, procedura resa più semplice dal fatto che le sommità fiorite giungono alla filiera agro-erboristica integre e non già ridotte in piccoli

frammenti, poi si procede con un controllo sia microscopico per escludere eventuali contaminazioni, sia di sostanze o elementi estranei. Il requisito fondamentale per la sicurezza qualitativa della droga è che essa non sia sofisticata, adulterata o deteriorata.

Essendo la droga utilizzata fresca è importante accorciare il più possibile i tempi che intercorrono tra la raccolta e i processi di trasformazione per evitare fenomeni degradativi della stessa.

Le sommità fiorite della Stella alpina sono quindi macinate utilizzando un mulino a coltelli che consente così di suddividere il materiale vegetale in unità più piccole, riducendone le dimensioni. Questo è un processo meccanico che ha lo scopo di aumentare la superficie di contatto tra droga e solvente, per accrescere il potere estrattivo di quest'ultimo e favorire un processo più rapido e completo. Infatti, grazie a quest'operazione, a parità di massa, si ha un aumento della superficie specifica con un parallelo aumento della superficie di materiale a contatto con il solvente .

2.3.2 Estrazione

La Stella alpina così preparata passa quindi ai processi di estrazione che consentiranno di separare i principi attivi desiderati dal materiale vegetale che li contiene. Questa fase è il cuore del processo produttivo e avviene mediante macerazione. La scelta del metodo estrattivo dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del principio attivo e i principali parametri da considerare sono:

- volatilità del principio attivo;
- termostabilità del principio attivo.

La scelta del solvente estrattivo è subordinata alla solubilità del principio attivo o del metabolita secondario utile, del quale non dovrà alterare la struttura chimica, e dovrà estrarlo selettivamente rispetto ad altri. I solventi ideali devono cioè estrarre soltanto le sostanze farmacologicamente utili, evitando quelle antagoniste o con caratteristiche sfavorevoli che potrebbero peggiorare le qualità organolettiche dell'estratto. Tra i solventi inorganici per preparazioni erboristiche o cosmetico si usano prevalentemente acqua, alcol e glicerina.

Nella scelta di un solvente o di una miscela di essi, è necessario considerare:

- La selettività;
- L'inerzia chimica nei confronti dei principi attivi da estrarre;
- La praticità d'uso;

- La viscosità bassa;
- L'economicità;
- La protezione ambientale;
- La sicurezza d'impiego per gli operatori.

I solventi da impiegare per l'estrazione sono quindi scelti sulla base di un compromesso tra le esigenze dell'estrazione, della stabilità e della conservazione dei principi attivi, ma anche del tipo di preparazione nel quale tale prodotto estratto verrà impiegato.

La frazione del fitocomplesso della Stella alpina che si vuole isolare per estrazione è più polare, si utilizza quindi di preferenza alcol etilico, in miscela con acqua che scioglie la maggior parte dei costituenti di un estratto, anche quelli indesiderati, poiché favorisce il rigonfiamento cellulare e la diffusione dei principi attivi. L'acqua presenta però un alto punto di ebollizione e facilita l'insorgenza di fenomeni idrolitici e degradativi. La presenza di alcol etilico in miscela con acqua serve proprio per stabilizzare le soluzioni acquose, perché l'alcol agisce da conservante, inibendo la crescita di microrganismi e riducendo al minimo le reazioni d'idrolisi. L'alcol usato da solo, invece tende a indurire la superficie del materiale vegetale, favorendo la precipitazione di proteine e riducendo la capacità estrattiva (Morelli, 2006).

L'acqua che si usa per l'estrazione deve essere inodore, insapore, limpida, incolore ed essere esente da patogeni o da sostanze nocive.

Il metodo utilizzato per l'estrazione dei principi attivi della Stella alpina è la macerazione. Per macerazione s'intende l'estrazione del materiale vegetale con un solvente a temperatura ambiente. La droga frantumata è posta a bagno nel solvente, costituito da una miscela idroalcolica, all'interno di cisterne di acciaio inossidabile e coperchio a cerniera, a una T° non superiore a 30°C per ventuno giorni. Il contatto del solvente con la droga deve avvenire per aggiunta di quest'ultima al solvente presente in cisterna, mescolando in modo da uniformare la massa e permettere a tutto il materiale di essere bagnato dal solvente.

Importanti quindi per la migliore riuscita dell'operazione sono:

- il tipo di solvente, il grado alcolico del solvente in caso di estratto idroalcolico e la temperatura;
- l'efficienza e la corretta agitazione preliminare della massa;
- il tempo di contatto tra droga e solvente;
- il grado di suddivisione della droga.

La Stella alpina, opportunamente preparata e pesata, è quindi posta con un rapporto 1:8 in soluzione idroalcolica per ventuno giorni. Tal estratto non richiede l'aggiunta di preservanti poiché la presenza e la quantità di alcol garantiscono la conservazione ottimale dell'estratto.

La Farmacopea Ufficiale Italiana (FUI) descrive le diverse metodiche estrattive e i rapporti droga/solvente da applicare secondo il diverso tipo di estratto che si vuole ottenere, basandosi su pratiche eseguite con pianta secca. Essendo la droga utilizzata fresca deve essere sempre tenuto in considerazione il tenore di acqua iniziale contenuto nella pianta durante la pratica industriale. La descrizione e le metodiche applicabili alla Stella alpina però non sono presenti nella FUI poiché tale pianta non è annoverata nell'elenco di piante riportate.

La quantità di acqua presente quindi, è stata ricavata in seguito alla conduzione di prove empiriche basatesi sulla differenza ponderale di una quantità nota di droga fresca posta in essiccatoio fino a completo essiccamento (da 1 kg di droga fresca, posta in essiccatoio a 20°C, si sono ottenuti 350 gr di droga secca).

2.3.3. Torchiatura

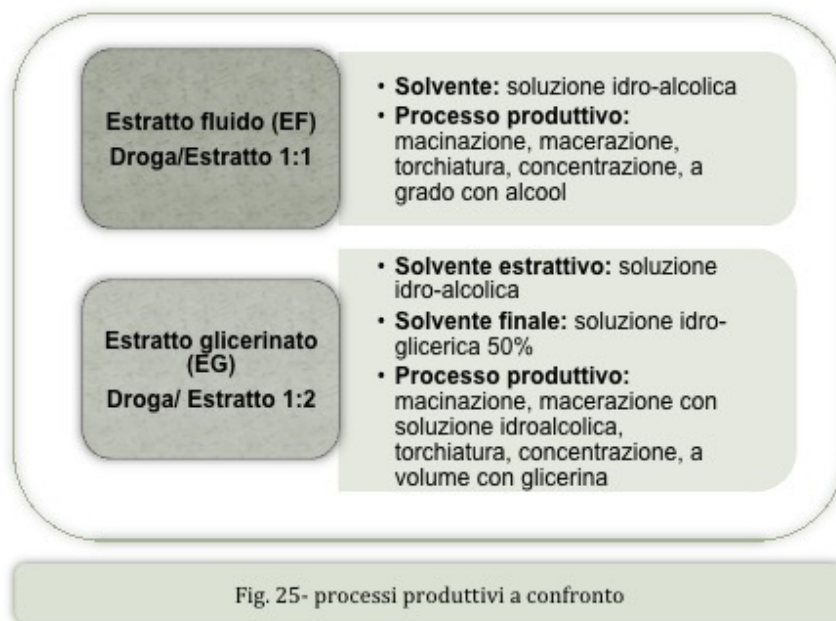
Al termine del processo di estrazione, la droga esausta Stella alpina, appare come una massa densa e pastosa immersa nel solvente. È quindi passata in un torchio, dove è sottoposta a una pressione meccanica che consente di aumentare le rese di estratto rimuovendo completamente la soluzione estrattiva che rimarrebbe, altrimenti, adesa al materiale vegetale. Il solvente raccolto dalla torchiatura viene poi lasciato decantare per circa ventiquattro ore in modo da separare per sedimentazione la frazione di estratto da eventuali impurità e residui vegetali.

2.3.4 Concentrazione

L'estratto di Stella alpina, ora limpido, viene concentrato per eliminare il solvente e condensare i principi attivi della pianta fino ad ottenere un rapporto di estratto 1:1 rispetto alla droga fresca pesata all'inizio dei processi di trasformazione. Si utilizza un concentratore in grado di creare il vuoto, infatti, l'abbassamento della pressione permette di usufruire di una quantità di energia termica minore per il passaggio del solvente a vapore che quindi evaporare ad una temperatura di circa 40°C. Tale accorgimento consente anche il trattamento di estratti aventi principi attivi termolabili.

Il processo di concentrazione ha luogo fino a quando il liquido, che è separato per evaporazione, ha un peso tale da consentire di ottenere, per differenza, un concentrato pari al peso della droga impiegata inizialmente.

Si ottengono due tipi di estratti (Figura 25):



Estratto fluido: è una preparazione liquida nella quale, in generale, una parte in peso corrisponde a una parte in peso di materia prima essiccata. L'estratto fluido (EF) è preparato mediante macerazione con soluzione idroalcolica e successiva concentrazione fino a raggiungere un rapporto finale droga\estratto 1:1. Si ottiene così una soluzione contenente la stessa quantità di principio attivo contenuto nella pianta di origine.

Estratto glicerinato: è una preparazione liquida ottenuta mediante estrazione con soluzione idroalcolica, concentrazione e successiva aggiunta di glicerina vegetale. Il rapporto finale droga\estratto è di 1:2. Tal estratto richiede l'aggiunta di conservanti in quanto, la miscela droga\soluzione idroglicerica può andare incontro a contaminazione microbica. Si aggiunge quindi il conservante EUXIL 9010 (Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin) in quantitativo 1% sul totale estratto\soluzione idroglicerica.

2.3.5 Controllo di qualità dell'estratto

Gli estratti di Stella alpina ottenuti, per essere considerati conformi all'utilizzo, devono subire una serie di controlli che ne garantiscano la qualità.

Tali controlli si basano sulla valutazione di aspetti organolettici quali l'aspetto, l'odore e il colore, e sulla determinazione di parametri quali il pH, la densità, l'indice di rifrazione, il grado alcolico (nel caso di estratto contenente alcol), la carica microbica, la presenza di residui tossici quali pesticidi, metalli pesanti ed allergeni.

Al termine di tali controlli il prodotto è accompagnato da una scheda tecnica che ne certifica la qualità.

CAPITOLO 3

I fitocostituenti di *Leontopodium alpinum*

La natura è da sempre un'affascinante fonte d'interesse per gli studiosi alla continua ricerca di nuove sostanze. Fin dai tempi più remoti, infatti, l'uomo ha imparato a conoscere, poco a poco, le proprietà medicinali di molte piante e a utilizzarne foglie, fusti, fiori, semi, radici ed essenze a scopo curativo.

Con il termine "composti naturali" si intende tutte quelle sostanze prodotte da organismi viventi. Per quanto riguarda il mondo vegetale, esse sono generalmente suddivise in tre ampie categorie:

1- metaboliti primari: rappresentati generalmente da macromolecole (carboidrati, proteine, lipidi e acidi nucleici) presenti in tutte le cellule e indispensabili per lo svolgimento del metabolismo cellulare della pianta (Bruni, 2003).

2- metaboliti intermedi: sono precursori biosintetici, non biologicamente attivi, a basso peso molecolare derivati da carboidrati e amminoacidi soggetti a rapida trasformazione nei metaboliti speciali (Bruni 2003).

3- metaboliti secondari o speciali: sono molecole derivate dai metaboliti intermedi tramite l'attivazione di specifiche vie enzimatiche; sono espressione dell'individualità della specie o del genere cui appartiene la pianta e rappresentano i fitocostituenti che caratterizzano l'uso medicinale della droga; vi è attualmente un grande interesse nella loro estrazione da fonti naturali, modificazioni strutturali e studio delle attività biologiche in quanto si è osservato che essi hanno spesso un ruolo ecologico nella regolazione delle interazioni fra piante, microrganismi, insetti e animali.

La presenza dei metaboliti secondari, infatti, è spiegata con il fatto che la pianta, a differenza degli animali, non possiede un sistema di difesa immunitario e non è dotata di mobilità e di conseguenza deve provvedere alla sua sopravvivenza mediante sistemi di difesa meccanica e chimica, sia passiva (accumulando sostanze che possono nuocere agli erbivori) o attiva (sintetizzando sostanze tossiche solo dopo lo stimolo dovuto all'attacco di predatori). I metaboliti speciali sono quindi fattori di adattamento specifico in grado di conferire alcuni vantaggi selettivi per gli organismi che li sintetizzano in tessuti speciali e in precisi momenti del loro ciclo vitale (Bruni, 2003).

3.1 Vie metaboliche primarie e metaboliti secondari

I principi attivi che caratterizzano la droga ottenuta dalla *Stella alpina*, sono classificati in base alla struttura chimica come sostanze organiche fenoliche. La loro sintesi (Figura 26), ha inizio con la via metabolica primaria (che comprende processi fondamentali quali fotosintesi, glicolisi e ciclo di Krebs), prosegue poi con il cammino biogenetico dei polichetidi e più frequentemente con la via dell'acido scichimico. Tuttavia le due vie sono anche complementari essendo alcune classi di composti fenolici derivate da una partecipazione simultanea di unità derivate dai due cammini, il che porta alla formazione di composti a biogenesi mista come nel caso dei flavonoidi (Bruni, 2003).

Via dell'acido scichimico: numerosi fenoli sono sintetizzati a partire dall'acido scichimico, un importante metabolita intermedio che deriva direttamente dai carboidrati e dotato di struttura cicloesamica poli ossigenata (Bruni, 2003). Da questo composto, avrà poi origine l'amminoacido aromatico fenilalanina, e, in seguito a deaminazione mediata dall'enzima fenilalanina ammoniacasi (PAL), si avrà formazione di acido trans cinnamico, il precursore diretto delle sostanze fenoliche.

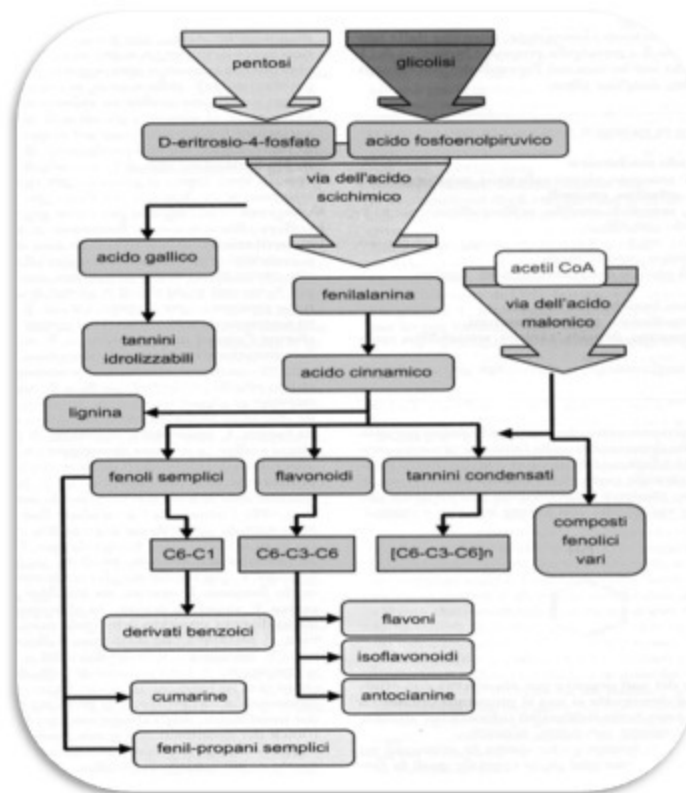


Fig. 26 - sintesi dei derivati fenolici (Bruni, 2003)

3.2 Le sostanze fenoliche

Le sostanze fenoliche rappresentano una classe di composti organici naturali caratterizzati dalla presenza di almeno un anello aromatico, mono o pluri-sostituito da gruppi ossidrilici. Una classificazione generale delle principali classi di composti fenolici prende in considerazione lo scheletro carbonioso che costituisce l'asse fondamentale per la differenziazione strutturale. A tal scopo si fa riferimento alla tabella 4.

Struttura	Classi fenoliche
C_6	Fenoli semplici
C_6-C_1	Acidi idrossibenzoici
C_6-C_2	Acetofenoni e acidi fenilacetici
C_6-C_3	Acidi cinnamici, cumarinici e isocumarinici
C_6-C_4	Naftachinoni
$C_6-C_1-C_6$	Benzofenoni e xantoni
$C_6-C_2-C_6$	Antrachinoni
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoidi
$(C_6-C_3)_2$	Lignani
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Bioflavonoidi
$(C_6-C_3)_n$	Lignine
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Proantocianidine

Tabella 4 -Classi fenoliche e loro classificazione in base allo scheletro carbonioso (Harborne, 1989)

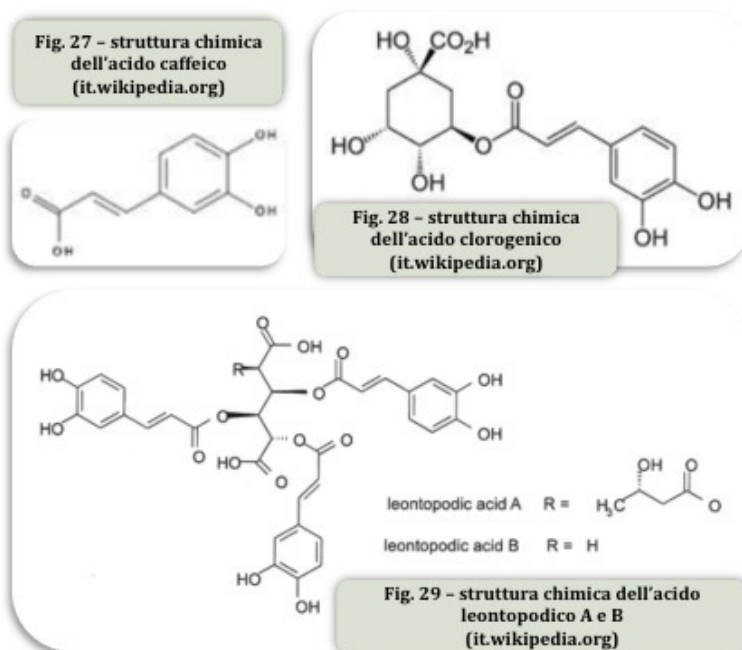
Di seguito saranno descritte le singole classi fenoliche a cui appartengono i principi attivi identificati in *Leontopodium alpinum*:

3.2.1 Acidi idrossicinnamici

Dalla titolazione delle sommità fiorite di *Stella alpina*, è risultato che gli acidi idrossicinnamici sono presenti in una concentrazione variabile tra il 4.99-6.21% (Ganzera, 2012), tale quantità, come già accennato, è strettamente dipendente ed estremamente influenzata da fattori naturali ed artificiali.

Gli acidi idrossicinnamici sono fenilpropanoidi derivanti dall'acido cinnamico. Quelli identificati nella droga sono:

- **Acido caffeico** (Fig. 27), un importante acido diidrossilico presente in tutte le piante superiori, sia come tale, sia come precursore, sia come unità acilante (Bruni, 2003).
- **Acido clorogenico o acido-3-caffeichinico** (Fig. 28), composto che deriva dall'esterificazione dell'acido caffeico con l'acido chinico.
- **Acidi leontopodici A e B** (Fig. 29): sono composti caratteristici di questa specie vegetale presenti in concentrazione variabile tra il 4.21-5.05% (Ganzera, 2012). Si tratta di molecole di recente scoperta, le prime pubblicazioni relative a questi principi attivi, risalgono infatti al 2005 (Schwaiger, 2005). Il crescente interesse della comunità scientifica per questa pianta, ha permesso di eseguire indagini strumentali mirate per identificare la struttura chimica di questi nuovi componenti appena isolati. Gli acidi leontopodici B sono costituiti da una molecola di acido esarico (o glucarico) esterificata in 3', 4', 5' con tre molecole di acido caffeico; l'acido leontopodico A presenta, invece, un'altra esterificazione in 2'.



3.2.2 Flavonoidi

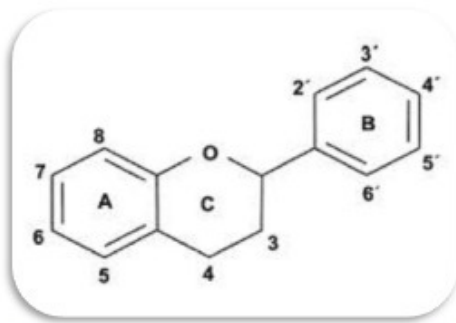


Fig. 30 - struttura di base dei flavonoidi
(lem.ch.unito.it)

I flavonoidi, presenti nelle infiorescenze di *Stella alpina* in una quota compresa tra 0,25-0,34% (Ganzer, 2012), rappresentano un ampio e complesso gruppo di composti polifenolici derivati dal flavone 2-fenil-benzopirone che è costituito da un sistema tricyclico basato su un anello aromatico A, fuso con un anello di tipo piranico C, legato in posizione 2 ad un terzo anello di tipo aromatico B. Le sostanze che

appartengono a questa classe, hanno quindi come struttura di base lo scheletro tricyclico a 15 atomi di carbonio (C₆-C₃-C₆) in cui sono riconoscibili 3 anelli (A,B,C), (Fig. 30).

La classe dei flavonoidi è a sua volta suddivisa in sottogruppi in base al legame tra l'anello C e l'anello B, allo stato di ossidazione e al numero e alla posizione dei vari sostituenti.

La diversa funzionalizzazione dell'anello centrale C genera le varie classificazioni e le relative denominazioni: catechine, flavani, flavoni, isoflavani, isoflavoni, flavonoli, ecc. (Fig. 31).

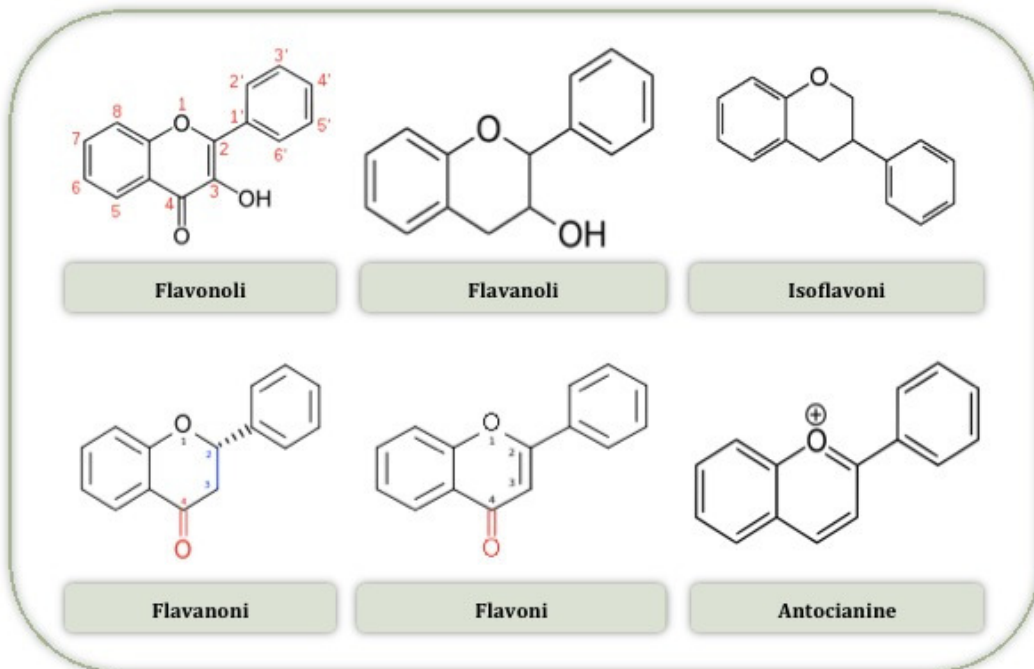


Fig. 31- classificazione dei flavonoidi
(it.wikipedia.org)

I flavonoidi presenti nelle matrici vegetali sono spesso glicosilati, cioè legati ad uno o più zuccheri, perché più facilmente trasportabili nei fluidi biologici a base acquosa. Il tipo di zucchero e la posizione in cui è legato nell'aglicone (flavonoide senza zucchero) aumenta ulteriormente la variabilità di molecole che si possono trovare in natura.

I flavonoidi identificati in *Leontopodium alpinum* riportati in letteratura (Schwaiger, 2006) sono:

- **Quercetina** (Fig. 32) è un tetraossiflavonolo e rappresenta la componente agliconica di vari glicosidi, tra cui la rutina. È uno dei flavonoidi più comuni in quanto è isolabile da numerose specie vegetali.

- **Rutina** (Fig. 33), flavonolo caratterizzato dalla presenza di un eterociclo di tipo γ -pirone glicosilato in posizione 3 con un disaccaride rutinosio.

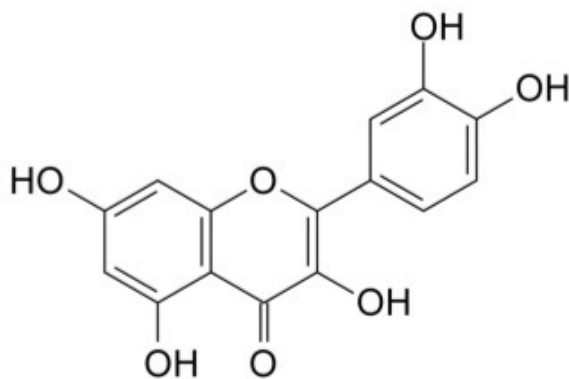


Fig. 32- struttura chimica della quercetina
(physicianswholisten.blogspot.com)

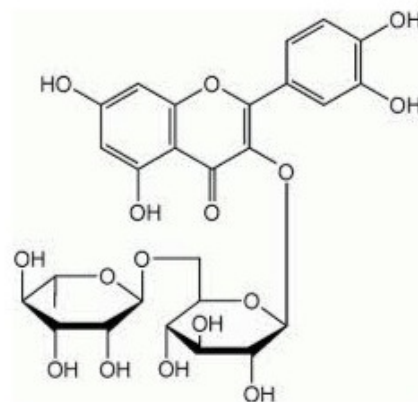
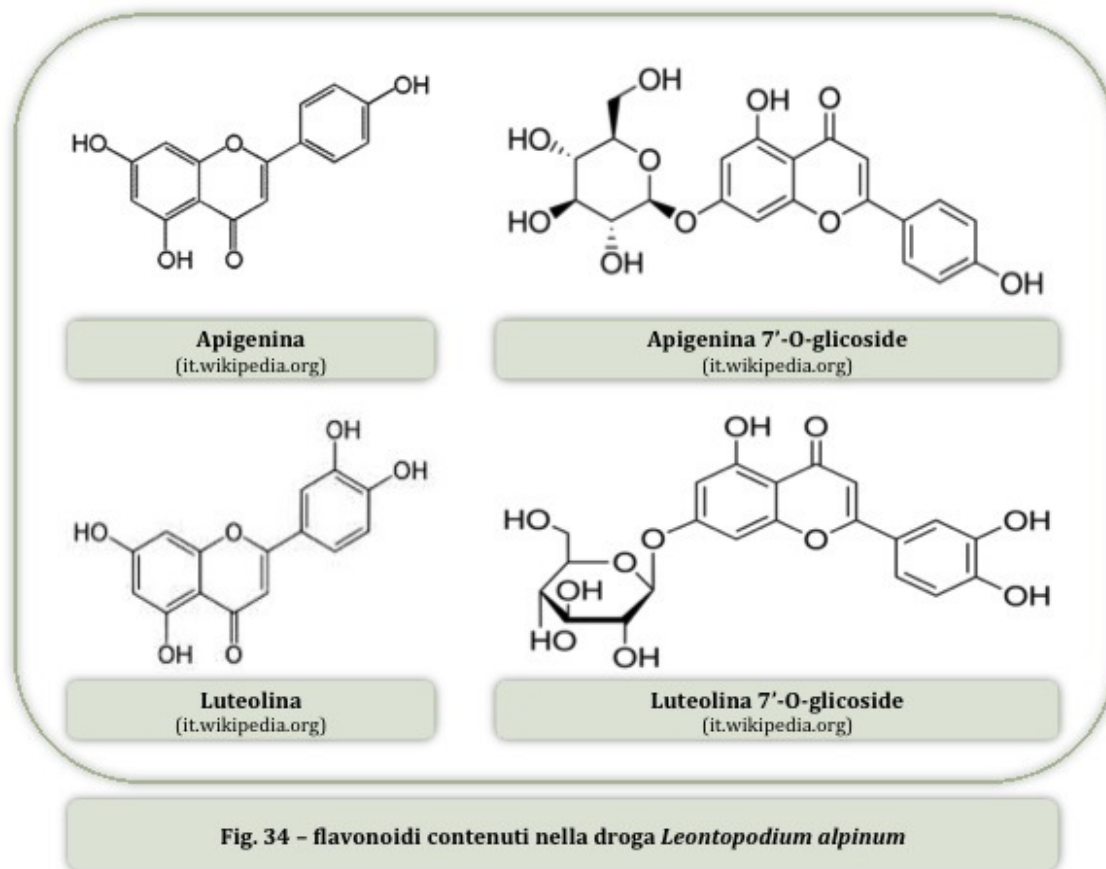


Fig. 33- struttura chimica della rutina
(it.wikipedia.org)

- Flavoni rappresentati da: **apigenina**, **apigenina 7'-O-glicoside** e **luteolina** e i rispettivi derivati mono e di-glicosilati quali **luteolina 4'-O-glicoside**, **luteolina 7'-O-glicoside**, **luteolina 7'4'-O-glicoside** (Fig. 34).



3.2.3 Lignani

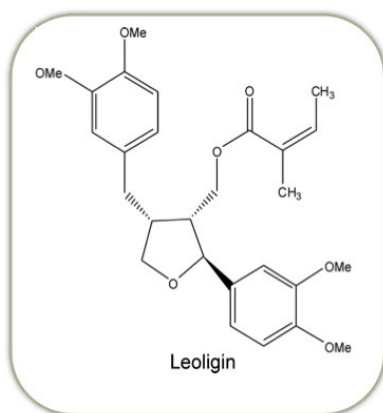


Fig. 35- struttura chimica di leoligina
(cardiovascres.oxfordjournals.org)

Leoligina (Fig. 35) è il principale lignano contenuto il *Leontopodium alpinum* (Duwensee, 2011). I lignani sono sostanze fenoliche derivate dalla condensazione di due unità fenilpropanoidiche (C_6C_3). Biosinteticamente rappresentano una forma alternativa di utilizzazione dei precursori cinnamici rispetto alla polimerizzazione della lignina¹⁷; si tratta quindi di prodotti tipicamente presenti nei tessuti legnosi (Bruni, 2003).

¹⁷ La lignina è un componente della parete secondaria delle cellule vegetali che deriva dall'unione di molte unità fenilpropanoidiche.

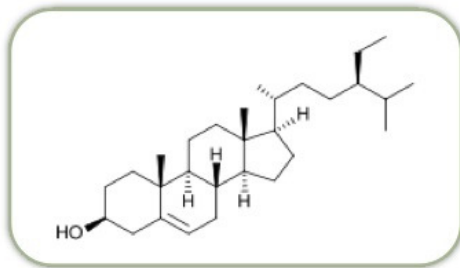


Fig. 36- struttura chimica del β -sitosterolo
(it.wikipedia.org)

3.3 Fitosteroli

Sono composti triterpenici steroidal del tipo ciclo-pentano-peridro-fenantrene, largamente distribuiti nel regno vegetale. In *Leontopodium alpinum* è presente il **β -sitosterolo** (Fig. 36.)

CAPITOLO 4

L'attività biologica di *Leontopodium alpinum*

I primi saggi compiuti sulla Stella alpina, sono stati condotti nel 1936 e si riferiscono alla pubblicazione "Pharmacological action of *Leontopodium alpinum*" (Carello, 1936). Per molti decenni poi, la comunità scientifica ha dimenticato l'enorme potenziale nascosto tra le infiorescenze di questa bellissima pianta. Solo di recente, il risvegliato interesse degli scienziati di tutto il mondo, ha permesso di identificare e quantificare il profilo fitochimico nonché di avviare ricerche mirate atte ad individuare l'attività biologica che caratterizza la droga ottenuta da questa specie vegetale. Il trasporto e l'elevato coinvolgimento degli studiosi si è concentrato soprattutto dal 2008 ad oggi, anni in cui sono stati pubblicati diversi studi sulle possibili applicazioni ad uso salutistico della pianta e sono stati inoltre registrati alcuni brevetti relativi a formulazioni cosmetiche contenenti estratti di *Leontopodium alpinum*.

Le ricerche effettuate hanno evidenziato che la Stella alpina è una pianta caratterizzata dall'elevata presenza di sostanze fenoliche, una vasta classe di composti organici che presentano un'importante azione antiossidante, che si manifesta ostacolando la formazione dei radicali liberi, ma che può essere sfruttata anche per limitare il danno ossidativo indotto da altri agenti come per esempio le micotossine (in particolare nei confronti dell'aflatossina B1) e i raggi UV. Nei confronti dei danni indotti dalle radiazioni solari, questa pianta manifesta anche un'azione antiinfiammatoria indiretta in quanto va a limitare gli effetti nocivi proinfiammatori che le irradiazioni producono a livello cellulare.

Dalle indagini scientifiche svolte, inoltre, è possibile attribuire alla Stella alpina anche un'azione antibatterica che si manifesta in particolare nei confronti di alcuni ceppi batterici, scoperta tra l'altro, che conferma l'uso tradizionale della pianta (Schwaiger, 2005; Costa, 2008; Lulli, 2012).

4.1 L'attività antiossidante della Stella alpina

Per antiossidante s'intende "qualsiasi sostanza che, presente in concentrazione molto bassa rispetto a quella di un substrato ossidabile, è in grado di ritardare o inibire significativamente l'ossidazione di quel substrato" (Halliwell & Gutteridge, 1989).

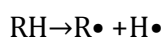
4.1.2 L'ossidazione lipidica

L'irrancidimento ossidativo, o autossidazione, è un fenomeno che interessa principalmente gli acidi grassi polinsaturi, costituenti fondamentali della struttura e garanti dell'integrità funzionale delle membrane biologiche. L'ossidazione lipidica può pertanto indurre *in vivo* imponenti danni biologici, oltre ad essere causa, negli alimenti, di odori e sapori sgradevoli.

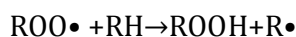
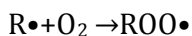
Il termine ossidazione indica un insieme specifico di reazioni derivanti dalla combinazione chimica dell'ossigeno con gli acidi grassi, sia liberi che esterificati.

Secondo la teoria più comunemente accettata (Rovellini et al., 1997) l'ossidazione dei lipidi avviene attraverso una serie di reazioni radicaliche a catena nelle quali è possibile distinguere tre stadi definiti di "induzione", "propagazione" e "terminazione".

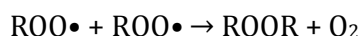
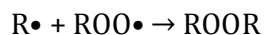
Nella fase di "induzione", l'attivazione di una molecola di acido grasso (RH) porta alla formazione di un radicale alchilico (R•):



Quando la quantità dei radicali alchilici ha raggiunto una sufficiente concentrazione, si ha la fase di "propagazione": per addizione di ossigeno su di un atomo di carbonio adiacente a un doppio legame si forma il radicale perossidico (ROO•), che a sua volta, estraendo un idrogeno da una molecola intatta, produce un altro radicale ed un idroperossido (ROOH):



L'unione di radicali liberi tra loro, sottraendo gli stessi alla catena, determina la "terminazione" delle reazioni a catena:



4.1.3 I radicali liberi

Nelle cellule del corpo umano, così come in ogni organismo aerobico, avvengono processi biochimici che consumano ossigeno per la generazione di energia. Dal processo di utilizzazione dell'ossigeno (ossidazione), si producono tuttavia dei prodotti di scarto potenzialmente dannosi: i radicali liberi.

Dal punto di vista chimico i radicali liberi sono molecole o frammenti di molecole,

particolarmente instabili, poiché presentano uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno, formatosi in seguito (1) all'acquisizione o (2) alla perdita di un elettrone o (3) alla fissione omolitica di un legame covalente (Casarett et al., 2010). Questo induce i radicali liberi alla ricerca del proprio equilibrio chimico tramite acquisizione degli elettroni mancanti da altre molecole che, di conseguenza, diventano a loro volta instabili e cercano un altro elettrone da altre molecole, innescando così un meccanismo d'instabilità a catena.

Tra le molecole più reattive rientrano le "specie reattive dell'ossigeno" (ROS) suddivisibili in due categorie:

- i radicali liberi quali l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) e il radicale ossidrilico ($OH\cdot$) il ROS più reattivo e dannoso nei sistemi biologici;
- e molecole non radicali, come il perossido d'idrogeno (H_2O_2).

La produzione endogena di ROS è da considerarsi un processo fisiologico, essa ha infatti luogo principalmente nei mitocondri, dove avvengono i processi ossidativi con trasporto di elettroni (respirazione cellulare) nei quali l'ossigeno funge da accettore finale di elettroni per la produzione di energia. L'ossigeno, quando svolge azione ossidante, viene esso stesso sottoposto a una serie di riduzioni in cui sottrae elettroni ad altre molecole, dando luogo ad intermedi radicalici. I ROS sono prodotti anche dal metabolismo degli acidi grassi poliinsaturi a partire dall'acido arachidonico durante la produzione degli eicosanoidi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni), molecole che svolgono importanti funzioni a livello dell'apparato vascolare. Un altro caso in cui la produzione di radicali liberi è considerata utile all'organismo è quello che si realizza nei macrofagi, in cui il radicale superossido viene utilizzato come "killer" contro batteri e virus patogeni. Oltre ai meccanismi endogeni, i fattori che causano la produzione di radicali liberi sono: stress, diete sbilanciate, alcool, fumo, assunzione di farmaci, intenso esercizio fisico, inquinamento ambientale e raggi solari.

L'alta reattività dei radicali liberi può causare reazioni spesso indesiderate e lesive per le cellule e, quindi, per i tessuti e per gli organi; un eccesso di ROS, infatti, contribuisce ai processi d'invecchiamento dell'organismo e della pelle (Van Der Loo *et al.*, 2003), è implicato nello sviluppo dei tumori e di malattie croniche neurodegenerative e cardiovascolari.

In condizioni normali il danno che i radicali liberi possono causare a DNA, proteine e lipidi è prevenuto dalla presenza meccanismi di difesa endogeni, se questi però non forniscono una protezione sufficiente, assumono particolare rilievo gli antiossidanti

esogeni naturali, come quelli rappresentati nella droga di *Leontopodium alpinum*.

4.1.4 Meccanismo d'azione degli antiossidanti

Gli antiossidanti si possono distinguere in due tipologie in base al meccanismo d'azione: Tipo I: "**Chain breaker**". Agiscono da inattivatori di radicali liberi donando idrogeno o trasferendo un singolo elettrone alle specie radicaliche (in realtà questi meccanismi possono aver luogo anche contemporaneamente, ma sarà la struttura chimica dell'antiossidante, unitamente alle sue proprietà di solubilità, coefficiente di partizione e solvente, a determinare il meccanismo di azione prevalente). Sono composti che, grazie al potenziale di riduzione negativo, sono in grado di fornire ai radicali liberi gli elettroni di cui sono privi, ripristinando così l'equilibrio chimico del sistema in cui agiscono.

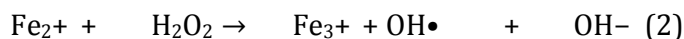
La loro efficacia dipende dalla stabilità dei radicali nei quali si trasformano; pertanto, più efficiente è la delocalizzazione degli elettroni spaiati prodotti nella reazione con i radicali liberi, maggiore è il loro potere antiossidante.

Tipo II: "**Metal scavenger**". Prevengono la formazione di radicali liberi agendo da agenti chelanti dei metalli.

Ioni metallici quali ferro o rame sono potenti pro-ossidanti che accelerano l'energia di attivazione delle reazioni d'iniziazione dell'ossidazione lipidica, generando radicali alchilici a partire da acidi grassi (1) :



I metalli inoltre perpetuando l'ossidazione lipidica, producendo radicali liberi attraverso la reazione di Fenton (2). Tale reazione è la principale via di formazione di radicali alcossilici, che sono i più reattivi e pericolosi ROS dei sistemi biologici:



In natura, i limiti tra le due classi di antiossidanti non sono così netti, in quanto alcune sostanze come i composti fenolici possono comportarsi contemporaneamente sia da *chain breaker* che da *metal scavenger* (Cuvelier, 1997).

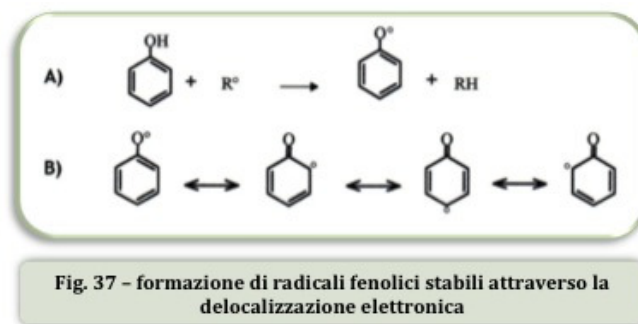
4.1.5 Attività antiossidante dei composti fenolici

I composti fenolici presenti nelle sommità fiorite della Stella alpina, sono antiossidanti a funzioni multiple: possono agire come agenti riducenti, come donatori di idrogeno, come

agenti chelanti dei cationi metallici e come quencher¹⁸ di ossigeno singoletto.

L'attività antiossidante dei vari composti fenolici è dovuta alla presenza di gruppi ossidrilici

legati alle strutture aromatiche ed alla geometria della molecola (Figura 37) e alla formazione di radicali fenolici stabili attraverso la delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche ed alifatiche.



Tale attività è confermata anche da uno studio pubblicato nel 2005 dove era valutato il potere antiossidante (mediante test di Briggs-Rauscher, metodo TEAC) e la relativa azione protettiva sul DNA (determinata mediante saggio di rilevamento del DNA danneggiato, 3D) esercitata dagli acidi leontopodici, gli acidi idrossicinnamici che caratterizzano la droga (Schwaiger, 2005).

4.2 Attività chemoprotettiva *in vitro* degli acidi leontopodici contro l'aflatossina B1

L'azione antiossidante della Stella alpina, in particolare, per quanto riguarda la frazione rappresentata dagli acidi leontopodici, è stata valutata *in vitro*, nei confronti dei danni indotti da micotossine¹⁹, in particolare contro la pericolosa aflatossina B1 (AFB1).

AFB1 è prodotto dalle muffe *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, che contaminano cereali, e noci in diverse regioni del mondo. Si tratta di un potente agente epatotossico ed epatocancerogeno coinvolto nell'eziologia del carcinoma epatocellulare. AFB1 è attivata dal citocromo P450, causando la formazione del 8,9 - epossido che è in grado di legarsi ai centri nucleofili cellulari di macromolecole quali la guanina nella catena del DNA. Recentemente è stato dimostrato che la tossicità di AFB1 è anche legata al suo potenziale pro-ossidante poiché induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno

¹⁸ Termine ("spegnimento") usato nel linguaggio tecnico per indicare, in genere, il venir meno di un fenomeno (Enciclopedia Treccani).

¹⁹ Le micotossine sono metaboliti secondari di diversi funghi e muffe prodotti in particolari condizioni di umidità, temperatura e pH.

(ROS), perossidazione lipidica e ossidazione del DNA *in vivo* e *in vitro* (Costa *et al*, 2008). Diversi studi dimostrano che gli antiossidanti, tra cui la Stella alpina, manifestano un'azione chemiopreventiva riducendo così i danni cellulari indotti dalle micotossine.

4.3 Attività antiinfiammatoria

Lo studio è stato condotto utilizzando un estratto di *Leontopodium alpinum* ottenuto da colture cellulari di callo²⁰ arricchito in acidi leontopodici, con il quale sono stati tratti cheratinociti umani primari precedentemente sottoposti ad irradiazione UVA + UVB per scatenare una risposta infiammatoria (Lulli, 2012). E' stato quindi dimostrato che la Stella alpina protegge le cellule dai danni indotti dai raggi UVA + UVB. La protezione potrebbe essere dovuta alla combinazione di almeno tre meccanismi distinti: assorbimento UV, scavenging dei radicali liberi e azione metallo chelante (Lulli, 2012).

Le piante rispondono a una varietà di stimoli ossidativi e la Stella alpina in particolare, proprio per il suo areale di distribuzione e habitat, è sottoposta a una forte un'irradiazione UV da cui si difende attraverso la sintesi di metaboliti secondari quali i composti fenolici ad azione antiossidante. Questa pianta quindi, potrebbe essere una preziosa fonte di sostanze antiinfiammatorie potenzialmente utilizzabili per il trattamento d'infiammazioni cutanee di vario genere. Negli ultimi anni, infatti, queste proprietà della Stella alpina sono state ampiamente sfruttate in preparazioni cosmetiche atte a proteggere e preservare la pelle contro le infiammazioni indotte da esposizione solare, causa oltre che d'infiammazione acuta anche di precoce invecchiamento ed elevata incidenza di tumori cutanei (Lulli, 2012).

4.4 Attività antibatterica

Lo studio riguardante l'attività antibatterica è stato condotto utilizzando sia gli estratti grezzi ottenuti dalle infiorescenze e dalle radici (anche se non costituiscono la parte della pianta maggiormente ricca in principi attivi), sia utilizzando i singoli costituenti del fitocomplesso (Dobner, 2003).

Dai test effettuati è emerso che gli estratti grezzi (in diclorometano) ottenuti utilizzando le parti aeree e radici provenienti da *Leontopodium alpinum* hanno mostrato significativa inibizione della crescita di *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

²⁰ Il callo è un ammasso di cellule indifferenziate che si forma nella pianta in corrispondenza di ferite, tagli e innesti. La produzione del callo da meristemi vegetali e da tessuti differenziati è la prima fase del processo biotecnologico che porta alla coltura in vitro dei vegetali.

aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e ceppi (Dobner, 2003).

I singoli componenti invece, hanno manifestato una debole azione antibatterica nei confronti di alcuni ceppi mentre sono risultati essere completamente inefficaci nei confronti di batteri quali *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Dobner, 2003).

Questa differenza dell'attività antibatterica dell'estratto grezzo e dei singoli componenti, può essere spiegata tenendo conto del fenomeno del sinergismo, per cui l'effetto derivato dall'azione combinata di tutti i costituenti del fitocomplesso risulta maggiore di quello ottenuto dalla somma delle azioni delle singole sostanze. Il sinergismo quindi, è considerato alla base della maggior tollerabilità delle droghe vegetali, della loro biodisponibilità e del più ampio spettro d'azione rispetto ai farmaci di origine sintetica (Bruni, 2003).

I risultati ottenuti da questa ricerca supportano l'uso tradizionale della Stella alpina per il trattamento dei disturbi respiratori e addominali (Dobner, 2003).

4.5 Usi e impieghi della Stella alpina nella medicina tradizionale

Recentemente, un certo numero di studi, condotti sia *in vitro* che su animali *in vivo*, hanno fornito le prime prove scientifiche che confermano l'impiego della Stella alpina nella medicina tradizionale, come un valido rimedio antiinfiammatorio ed antibatterico (Peroni, 2012; Safer, 2011; Dobner 2003; Lulli, 2012; Schwaiger, 2005).

Leontopodium alpinum ha una lunga tradizione come medicamento popolare, infatti, già nel 1582 ne era menzionato l'uso per il trattamento della diarrea e dissenteria (Tabernaemontanus²¹, 1582). Diverse altre applicazioni sono state descritte nel corso degli anni: nella medicina popolare europea, le parti aeree di questa pianta erano utilizzate per attenuare l'infiammazione e il dolore del sistema respiratorio (tonsilliti e bronchiti), del sistema gastrointestinale (gastrite, diarrea, dissenteria) e delle articolazioni (artrite reumatoide), erano quindi somministrate sia alle persone, ma anche al bestiame (Lulli, 2012).

Per le applicazioni orali, l'erba era bollita nel vino e mescolata con il latte, mentre per l'uso topico, le parti aeree della Stella alpina venivano bollite in acqua e l'estratto così ottenuto era applicato come impacco (Tabernaemontanus, 1582).

La maggior parte delle malattie per cui era impiegata la Stella alpina nella tradizione e cultura popolare, era di origine infettiva. Oggi sappiamo che la pianta ha realmente

²¹ Jacobus Theodorus (Jakob Dietrich), chiamato Tabernaemontanus (1525 - agosto 1590) è stato un medico e uno dei primi botanica ed erborista, il "padre di" botanica tedesca "

un'azione antibatterica (Dobner, 2003) e quindi poteva essere un valido medicamento cui ricorrere in caso di bisogno. Ancora una volta la scienza conferma ciò che i nostri antenati, esperti conoscitori della natura, avevano intuito.

4.6 Stella alpina e il mercato salutistico

L'ingresso di *Leontodium alpinum* nel mercato dei prodotti salutistici è recente. Probabilmente, ciò è dovuto al fatto che l'attenzione della comunità scientifica nei confronti di questa specie farmacognostica e il conseguente lavoro di ricerca e sviluppo, si è concentrato solo negli ultimi anni, ritardando così la possibilità di definire metodi di coltivazione e produzione tali da ottenere un approvvigionamento costante della droga e con elevati tenori di principi attivi. Bisogna, infatti, ricordare che la Stella alpina è una specie vegetale protetta e tutelata e pertanto è proibita la raccolta delle piante spontanee, che tra l'altro, porrebbero importanti criticità rispetto alla standardizzazione del profilo fitochimico, del rifornimento di droga adatto all'utilizzo in prodotti destinati al mercato su larga scala ed infine rispetto alla proiezione di efficacia e sicurezza salutistica.

Il ritardato interesse della scienza e il conseguente rallentamento a livello produttivo, hanno fatto sì, che, ad oggi, non siano ancora presenti in commercio prodotti destinati all'utilizzo interno, in quanto non è ancora chiaro il profilo di sicurezza, tollerabilità e tossicità di questa pianta in un eventuale impiego sistemico.

Le informazioni scientifiche ora disponibili riguardanti lo spettro dei fitocostituenti che caratterizzano questa pianta, hanno però reso possibile la formulazione di prodotti cosmetici, quindi ad utilizzo topico, contenenti Stella alpina. Diversi brevetti internazionali, infatti, utilizzano estratti di *Leontopodium alpinum*, che diventa così l'ingrediente che caratterizza creme viso destinate a tutti i tipi di pelle (Park, 2012; Xiang, 2012; Kim, 2010; Tanaka, 2009; Anon, 2007; Bottiglieri, 2007).

La funzione antiossidante della Stella alpina è quella che riveste maggior interesse dal mondo scientifico e cosmetologico. È stato dimostrato che i suoi principi attivi proteggono il collagene cutaneo dal danno ossidativo derivante dai radicali liberi prodotti dall'esposizione ai raggi solari (UVA/UVB) e nel corso di processi flogistici a carico dell'epidermide (Ponzo, 2009; Schwaiger, 2005; Aramoto, 2002;). Questa pianta quindi, trova impiego nelle preparazioni cosmetiche che devono proteggere la cute dall'azione nociva degli agenti atmosferici e dall'inquinamento ambientale ed è quindi

un ottimo ingrediente funzionale per prodotti anti-aging, solari e doposole e in creme idratanti.

È stata inoltre provata una capacità inibente della ialuronidasi, l'enzima responsabile di gran parte del danno dei tessuti cutanei e sottocutanei che si osserva in corso di acne, dermatite seborroica ed altre alterazioni della pelle di natura infiammatoria (Ponzo, 2009).

In cosmesi funzionale, la Stella alpina è ampiamente utilizzata nel trattamento purificante e normalizzante di pelli grasse, asfittiche, impure, con punti neri e comedoni, grazie alle sue proprietà antibatteriche ed antiossidanti (Ponzo, 2009).

Bisogna ricordare però, che proprio recentemente è stato dimostrato come non esista una correlazione diretta tra la capacità antiossidante di una sostanza funzionale e quella di una formulazione che lo contiene (Manfredini, 2002) e a tal scopo sono stati condotti studi specifici e mirati sulla Stella alpina, che hanno dimostrato che i suoi principi attivi non solo sono attivi singolarmente, ma mantengono la loro efficiente proprietà antiossidante anche inseriti in formulazioni cosmetiche²² (Manfredini, 2002; Ponzo, 2009).

4.6.1 Formulazione cosmetica contenente *Leontopodium alpinum*

Sul circuito commerciale italiano sono già presenti molte prodotti cosmetici che mostrano tra gli ingredienti funzionali la Stella alpina. Tra questi è stata scelta una crema viso giorno idratante (Fig. 38) su cui effettuare una valutazione relativa a formulazione, composizione ed eventuali criticità.

²² La potenzialità antiossidante di una formulazione antiaging viene di solito vantata mediante la determinazione della concentrazione degli antiossidanti presenti, effettuata con metodi analitici tradizionali, quali HPLC. Questo metodo di valutazione però, non tiene conto in ambito cosmetico di tutta una serie di variabili, come le possibili interazioni tra gli ingredienti funzionali e la presenza di altre sostanze all'interno della formulazione. È quindi stato messo a punto un nuovo protocollo per la valutazione strumentale mediante fotochemiluminescenza PCL (Manfredini, 2002).



Fig. 38- crema viso idratante contenente Stella alpina

Le sostanze presenti in un prodotto cosmetico possono essere raggruppate in maniera molto schematica in tre categorie principali (Prevedello, 2004):

- ingredienti di base o eccipienti,
- sostanze funzionali,
- additivi.

La Stella alpina può essere classificata come ingrediente funzionale, cioè come componente che dà la specificità d'azione al prodotto. In questa crema idratante sono presenti anche altri estratti vegetali funzionalizzanti quali: *Calendula officinalis*, *Centaurea cyanus*, *Equisetum arvense*, *Glycyrrhiza glabra* e *Camelia sinensis*.

L'analisi critica del prodotto si concentrerà esclusivamente sulle sostanze vegetali che caratterizzano l'effetto della crema in quanto di pertinenza di questo elaborato di tesi.

- ***Calendula officinalis***: è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Asteracee, di cui si utilizzano i capolini. È una delle erbe più utilizzate in campo cosmetico, soprattutto per le sue proprietà disarrossanti, lenitive ed antiflogistiche, conferite dalla presenza di flavonoidi (soprattutto glucosidi di isoramnetina e quercetina). La droga contiene inoltre caroteni, alcoli triterpenici, steroli e mucillagini. È quindi indicata per l'applicazione su pelle sensibile, delicata ed infiammata (Capozzi, 2010, Rigano, 2003; Bruni, 1999).

- ***Centaurea cyanus***: è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Asteracee, nota comunemente come fiordaliso, di cui si utilizzano i capolini, particolarmente ricchi in antociani, flavonoidi che conferiscono proprietà decongestionanti ed antiinfiammatorie. Le pectine invece sono particolarmente apprezzate per l'azione idratante; sono sostanze di natura polisaccaridica in grado di assorbire notevoli quantità di acqua generando geli fluidi (idro colloid) che, applicati sulla superficie cutanea, formano un film sottile ed elastico, in grado di cedere acqua allo strato corneo dell'epidermide senza poi sottrargliela quando la temperatura ambientale è elevata e l'umidità è bassa. Questa pianta trova impiego in diverse formulazioni cosmetiche destinate a pelli sensibili, disidratate ed arrossate (Capozzi, 2010; Rigano, 2003).
- ***Equisetum arvense***: pianta pteridofita appartenente alla famiglia delle Equisetacee. La droga è costituita dai cauli sterili particolarmente ricchi di sostanze minerali (soprattutto silice) che conferisce attività remineralizzante, rassodante ed elasticizzante per uso esterno (Bruni, 1999; Campanini 2004).
- ***Glycyrrhiza glabra***: pianta erbacea della famiglia delle Leguminose Papilionacee. La droga è costituita dalla radice essiccata e dagli stoloni che presentano elevate concentrazioni di saponine triterpeniche, principalmente glicirrizina, che manifesta attività antiinfiammatoria indiretta mediante stimolazione e potenziamento dei corticoidi. La pianta è quindi destinata a prodotti cosmetici per cute irritata, infiammata e sensibile (Bruni, 1999; Campanini 2004).
- ***Camelia sinensis***: pianta appartenente alla famiglia delle Teacee. La droga è costituita dalle foglie, ricche in caffeina, flavonoidi, catechine e polifenoli. Si caratterizza pertanto per l'azione antiossidante (Capozzi, 2010).

I componenti vegetali che caratterizzano questo prodotto, presentano un buono spettro di attività che agisce in sinergia con le proprietà manifestate da *Leontopodium alpinum*. Pertanto l'utilizzo della crema è adatto sia su cute normale, in modo da mantenerla in buono stato prevenendo così eventuali fenomeni di disidratazione, arrossamenti ed invecchiamento, che su cute sensibilizzata, in modo da ridurre l'iperreattività e proteggendola da ulteriori stimoli nocivi ambientali quali radiazioni solari, fenomeni atmosferici ed inquinamento.

CAPITOLO 5

Parte professionalizzante

Come esperienza professionalizzante del presente lavoro di tesi, svolta presso i laboratori di Biologia farmaceutica (Sezione di Botanica Applicata) del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, sono state applicate alcune strategie classiche di indagine farmacognostica sulla droga *Leontopodium alpinum*, pianta comunemente nota come Stella alpina. A questo proposito è stato ottenuto, mediante contatto diretto con l'azienda agricola produttrice, "Casanova Olga", un campione di *Leontopodium alpinum* infiorescenze, proveniente da Pejo (TN). Sulla droga si è operato un controllo d'identità e qualità anatomo-microscopico e macroscopica. Sono stati poi reperiti sul circuito commerciale dedicato (azienda agro-erboristica "Agripharma" che utilizza droghe della ditta "Casanova Olga") quattro campioni estratti da *Leontopodium alpinum* di diversa provenienza, modalità e matrice estrattiva:

CAMPIONI IN ESAME ESTRATTI DA *Leontopodium alpinum*

EFA ²³	Estratto fluido, Stella alpina Casanova "A"
EFB	Estratto fluido, Stella alpina Casanova "B"
EGB ²⁴	Estratto idro-glicerico, Stella alpina Casanova "B"
EGC ²⁵	Estratto idro-glicerico, Stella alpina Competitor "C"

La droga tramite la quale si sono ottenuti gli estratti EFA, EFB ed EGB, deriva dallo stesso cultivar, proveniente da medesima azienda agricola produttrice, "Casanova Olga". EGC, invece, si differenzia dagli altri campioni per tipologia di cultivar, azienda agricola

²³ EFA: estratto vegetale fluido ottenuto mediante esaurimento della droga fresca (sommità fiorite) con soluzione idroalcolica e successiva concentrazione sotto vuoto a temperatura ambiente, presso la società cooperativa agricola Agripharma.

²⁴ EGB: estratto vegetale ottenuto mediante esaurimento della droga fresca con soluzione idroalcolica sottoposto poi a concentrazione sotto vuoto a temperatura ambiente e stabilizzazione dell'estratto con glicerina naturale, presso la società cooperativa agricola Agripharma.

²⁵ EGC: estratto vegetale ottenuto mediante esaurimento della droga essiccata con soluzione idroalcolica sottoposto poi a concentrazione sotto vuoto a temperatura ambiente e stabilizzazione dell'estratto con glicerina.

produttrice, e per essere stato ottenuto partendo dalla droga essiccata, anziché da quella fresca, da cui sono stati invece ottenuti gli altri tre campioni.

Gli estratti EFA ed EFB, sono stati ottenuti dalla stessa matrice vegetale raccolta però in momenti diversi. I campioni differiscono quindi per il tempo balsamico²⁶.

Su tali campioni è stata operata una valutazione qualitativa dei principi attivi caratterizzanti (flavonoidi) mediante:

- confronto diretto tra campioni ottenuti partendo da droga fresca o essiccata, sottoposti agli stessi trattamenti di estrazione/concentrazione, al fine di valutare eventuali differenze macroscopiche nella tipologia o nell'abbondanza dei principi attivi nella droga di partenza;
- confronto diretto dei campioni, anche se ottenuti con procedimenti estrattivi differenti ma indirizzati allo stesso utilizzo, per confrontare il contenuto in principi attivi nei prodotti finali.

Essendo *Leontopodium alpinum* una droga innovativa scarsamente presente nel mercato salutistico, è stata svolta una ricerca bibliografica su banche dati scientifiche on-line (SciFinder®), appropriate ed attendibili, per l'individuazione dei componenti caratterizzanti la droga o gli estratti e di conseguenza indirizzare meglio la messa a punto di metodi analitici specifici.

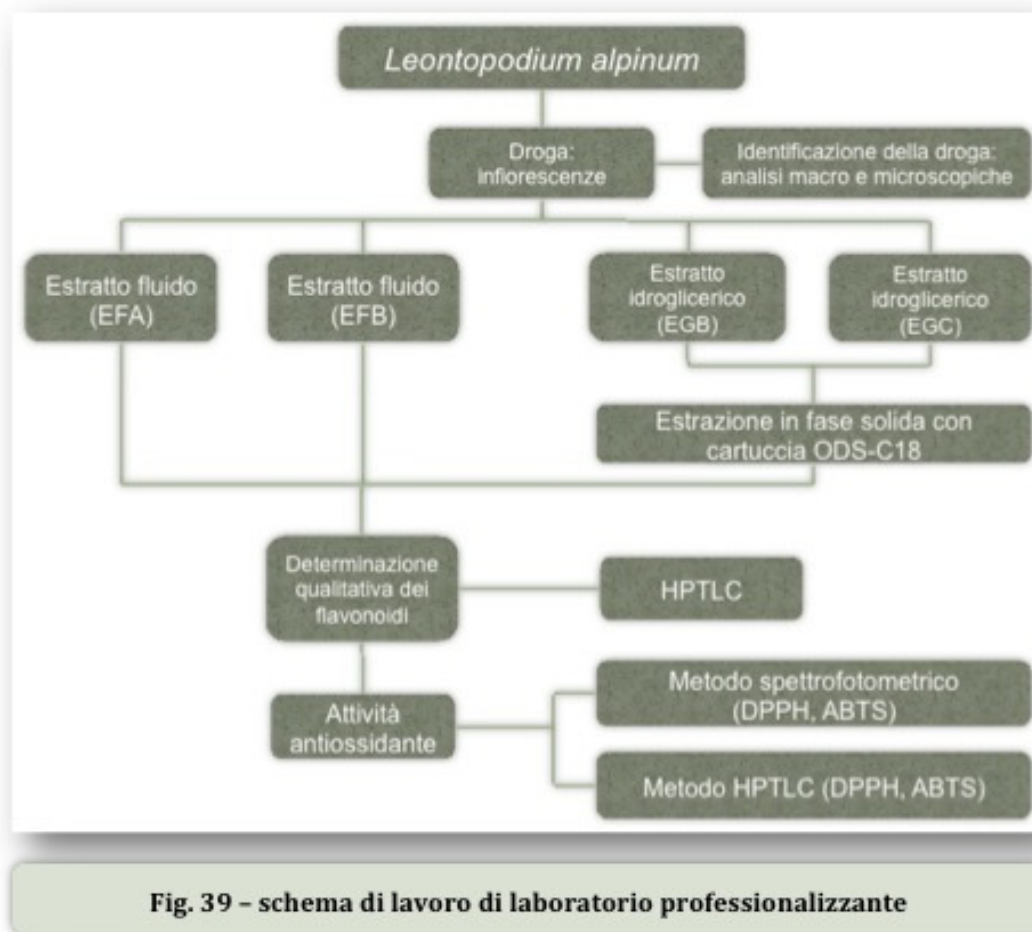
I campioni sono stati quindi sottoposti a :

- HPTLC seguendo la letteratura scientifica correlata all'indagine farmacognostica (Wagner, 2009), analisi che ha consentito di eseguire una valutazione qualitativa dei flavonoidi, presenti nei diversi estratti di *Leontopodium alpinum* messi a confronto rispetto agli standard commerciali.
- Valutazione dell'attività antiossidante con ABTS e DPPH tramite il metodo spettrofotometrico classico e il metodo HPTLC bioautografico, utilizzando i radicali DPPH• e ABTS•⁺ (Poli *et al.*, 2003).
- Gli estratti idroglicerici sono stati sottoposti a una preventiva estrazione su fase solida (SPE) ottimizzata al fine di eliminare la frazione glicerica che impedisce l'eluizione nelle analisi cromatografiche. I test di attività antiossidante con metodo spettrofotometrico sono stati invece condotti sull'intero fitocomplesso, opportunamente diluito con acqua.

²⁶ Tempo balsamico: il periodo entro il quale è opportuno effettuare la raccolta della pianta, periodo che influisce in maniera significativa sul contenuto in principi attivi della droga (Bruni, 2003).

Con quest'approccio analitico si sono evidenziate alcune differenze nel contenuto di principi attivi e nell'attività antiossidante tra i diversi campioni.

Tale procedura di lavoro, eseguita e descritta nella parte professionalizzante di questo lavoro di tesi, è schematizzata in figura 39 .



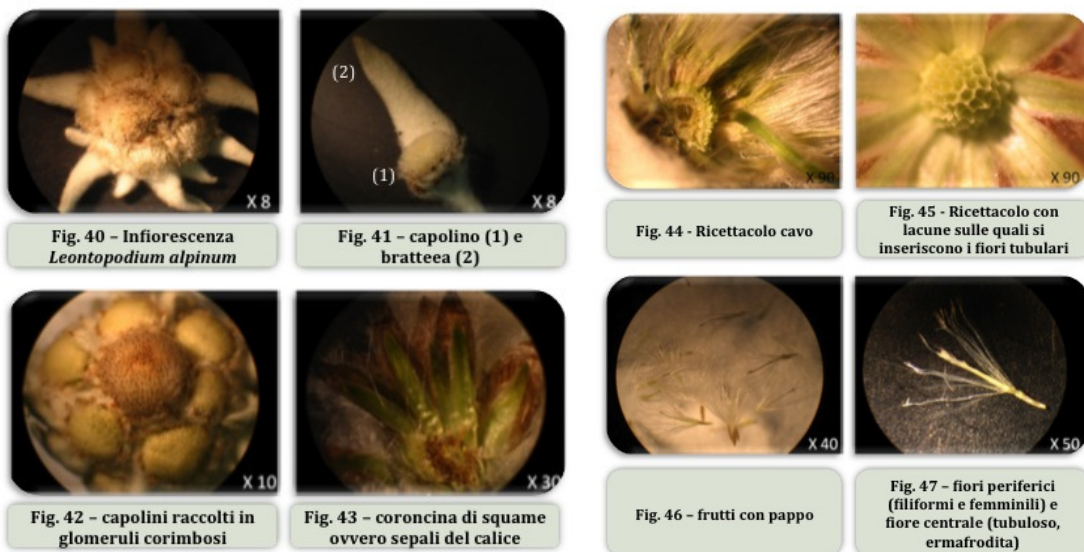
5.1 Saggio allo stereomicroscopio

La valutazione della droga pone come scopo l'identificazione dei caratteri morfologici e organografici caratterizzanti. Lo strumento di cui ci si avvale in tale controllo è lo stereomicroscopio, che permette di osservare gli elementi distintivi salienti della droga. Dall'osservazione si evince che le infiorescenze (Fig. 40) sono ad ombrella contratta, formate da alcuni capolini (3-7) raccolti in glomeruli²⁷ corimbosi²⁸ all'apice dei fusti, circondati da alcune brattee (o foglie fiorali) lanceolate, bianco nivee, raggianti,

²⁷ Glomerulo: gruppo di fiori che nell'insieme formano una palla, quasi sempre costituito da un'infiorescenza con peduncoli fiorali molto brevi (Bruni, 2003).

²⁸ Corimbo: tipo di infiorescenza in cui i fiori raggiungono il medesimo livello, mentre i peduncoli si dipartono da altezze diverse dall'asse principale (Bruni, 2003).

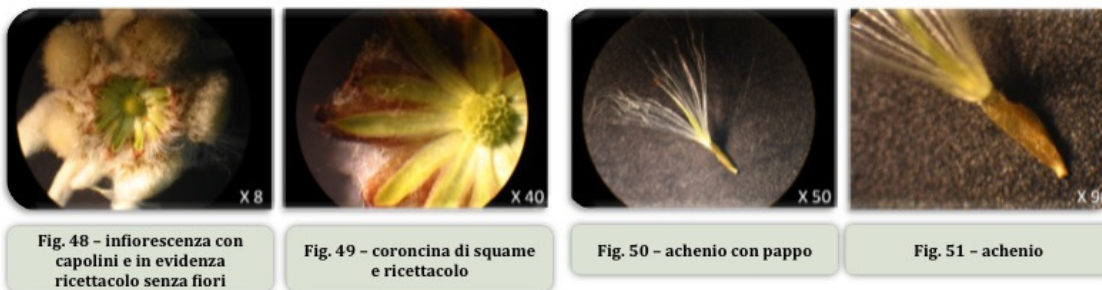
scariose²⁹ al margine e lanose (Fig. 41). I fiori sono attinomorfi³⁰, tetra-ciclici (formati cioè da 4 verticilli: calice – corolla – androceo – gineceo) e pentameri (calice e corolla formati da 5 elementi). Il capolino centrale è più sviluppato, quasi sessile e più grande, mentre quelli periferici sono brevemente pedunculati (Fig. 42). La struttura dei capolini vede esternamente un involucre emisferico o ovoide composto da diverse squame (Fig. 43) che fanno da protezione al ricettacolo cavo (Fig. 44) sulla cui superficie esterna (Fig. 45) s'inseriscono due tipi di fiori (Fig. 46): i periferici, che sono filiformi e femminili, e i centrali, che sono tubulosi, bianco-giallastri ed ermafroditi, ma maschili per aborto degli organi del gineceo (Fig. 47). Le squame interne dei capolini hanno una forma lanceolato-acuta con apice scarioso ma glabro, la colorazione è ferruginoso-scura (Fig. 48). La coroncina di squame rappresenta i sepali del calice (Fig. 49). L'involucro dell'infiorescenza si compone di 9 – 15 foglie bratteali lanceolate, patenti³¹, disposte a stella, con superficie bianco-lanosa che presentano una lunghezza maggiore rispetto al diametro del glomerulo dei capolini. Il diametro del glomerulo è pari a 3 – 6 cm. Mentre le dimensioni dell'involucro dei capolini ha una larghezza media di 4 mm ed una lunghezza media di 5 mm. I frutti sono acheni granulosi (Fig. 50) sormontati da un breve pappo piumoso di colore paglierino (Fig. 51). La dimensione dell'achenio è circa 1,3 mm mentre la lunghezza del pappo è mediamente di 4 – 6 mm (Pignatti, 1982).



²⁹ Scariosa: dicesi di squama con consistenza membranosa, non rigida e trasparente (Bruni, 2003).

³⁰ Attinomorfi: denominazione di un tipo di fiore che può essere diviso in parti uguali per mezzo di vari piani longitudinali. L'equivalente di simmetria raggiata (Bruni, 2003).

³¹ Patente: quando l'elemento considerato (peli, petali, peduncoli) sporge dal fusto ad angolo retto (Treccani).



5.2 Identificazione al microscopico ottico

L'esame microscopico al microscopio ottico è un'analisi importante nel caso di droghe triturate o polverate, mentre per quanto concerne la valutazione di droghe intere o limitatamente contuse è importante per confermare e ribadire quanto già determinato con l'esame macroscopico allo stereomicroscopio e per l'individuazione di eventuali anomalie microscopiche. Per eseguire questo saggio, è necessario un mezzo d'immersione e pertanto si utilizza spesso il cloralio idrato invece dell'acqua, perché schiarisce le strutture cellulari ed allontana le inclusioni d'aria (Capasso *et al.*, 2007). Per l'indagine identificativa del campione di *Leontopodium alpinum* e il riconoscimento dei tratti distintivi della droga è stato utilizzato il microscopio ottico Zeiss (AXIOLAB). Al microscopio sono stati osservati sia i fiori periferici (che sono filiformi e femminili) che quello centrale (è tubuloso, bianco-giallastro ed ermafrodita) (Fig. 52).

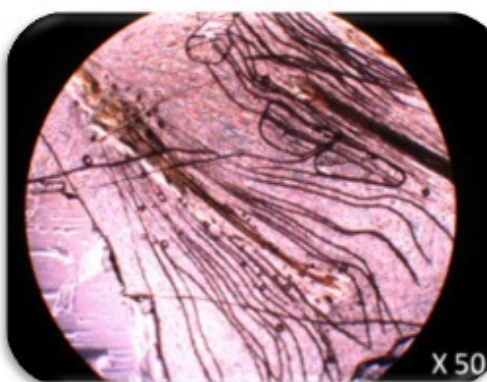


Fig. 52 - fiori periferici (filiformi e femminili) e fiore centrale (tubuloso ed ermafrodita)

Dopo la valutazione morfologica si è proceduto ad un'indagine fitochimica qualitativa.

5.3 Determinazione qualitativa dei flavonoidi mediante HPTLC

La determinazione qualitativa dei flavonoidi è stata eseguita mediante analisi HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography).

La cromatografia su strato sottile (TLC/HPTLC) è una tecnica molto diffusa, di semplice e rapida applicazione. Si caratterizza come utile strumento diagnostico in farmacognosia ed è indicato dalla Farmacopea Europea come saggio identificativo e qualitativo di droghe e loro derivati (fitocomplessi). Nella TLC/HPTLC si utilizzano lamine sottili di vetro, plastica o alluminio ricoperte di gel di silice o altro materiale assorbente (fase stazionaria). Sulla lastra vengono deposte le miscele dei composti da separare; successivamente la lastra viene inserita in una camera di sviluppo cromatografica dove sul fondo viene posto il solvente di eluizione.

Il solvente di eluizione sale per capillarità lungo la lastra e con esso migrano, a velocità diverse, i singoli componenti del fitocomplesso separandosi e fermandosi ad altezze diverse nella lastra, a seconda della loro diversa affinità con la fase stazionaria e con la fase mobile o eluente. La deposizione della miscela sulla lastra viene fatta con un depositore automatico (CAMAG LINOMAT V) dove vengono impostate le quantità di campione da deporre (in μl), la distanza della deposizione dalla base della lastra (in genere 1cm), la distanza fra le bande (in mm) e la velocità di deposizione ($\text{sec}/\mu\text{l}$) che varia a seconda del solvente in cui la miscela dei composti è disciolta. Quando la lastra è sviluppata, viene fatto evaporare il solvente sotto cappa chimica aspirante; alcuni composti, che sono caratterizzabili come pigmenti, sono visibili ad occhio nudo alla luce bianca o agli UV, mentre per altre classi chimiche si deve procedere con una derivatizzazione per rendere evidenti le bande nel visibile o in luce ultravioletta. L'HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) è una tecnica analitica simile alla TLC ma permette una maggiore risoluzione dei composti da caratterizzare in quanto utilizza una fase stazionaria con dimensioni delle particelle molto più piccole. Il riconoscimento dei diversi componenti si effettua calcolando l' R_f (fattore di ritardo) delle singole bande e confrontandolo con quello di standard o con dati di letteratura oltre che confrontando la corrispondenza di colore dopo derivatizzazione.

5.3.1 Estrazione in fase solida (SPE)

Per analizzare con tecnica cromatografica gli estratti idro-glicerici EGB ed EGC, si è reso necessario allontanare preventivamente la glicerina dai campioni poiché interferisce sulla corretta eluizione dei singoli componenti.

Allo scopo è stata ottimizzata una tecnica estrattiva in fase solida (SPE), i metodi cromatografici, infatti, sono utilizzati per separare i componenti di miscele sfruttando la diversa affinità delle molecole e degli ioni nei confronti di due diverse fasi.

La fase stazionaria presente in una colonna cromatografica è costituita da granuli di dimensioni tali da permettere lo scorrimento della fase mobile senza opporre eccessiva resistenza e di un opportuno materiale selezionato in base alla natura chimica dei componenti da separare.

Dopo il caricamento della miscela da separare che è depositata in testa alla colonna, si aggiunge in modo continuo la fase mobile (eluente) che, scorrendo attraverso la fase stazionaria, trascina con sé in modo selettivo i diversi componenti della miscela, formando così delle bande lungo la colonna.

La separazione cromatografica è attribuita alla diversa affinità delle sostanze nei confronti delle due fasi, fra loro immiscibili: più una sostanza è affine alla fase stazionaria, più a lungo viene trattenuta e così il suo scorrimento nella colonna viene rallentato rispetto a quello di sostanze meno affini a tale fase.

Durante l'eluizione, infatti, in ogni punto della colonna, la sostanza è coinvolta in un processo dinamico di trasferimento tra le due fasi: dalla fase stazionaria a quella mobile e viceversa, dovuto per lo più a interazioni deboli (come legami idrogeno, dipolo-dipolo e legami di van der Waals). Poiché i due processi avvengono in misura diversa per ogni sostanza, la miscela si separa nelle diverse componenti. (Cozzi *et al.*, 1998).

I principi della cromatografia sono sfruttati anche nell'estrazione in fase solida o SPE. Le cartucce SPE sono piccole colonne monouso già preimpaccate con quantità note di fase stazionaria, che consentono la purificazione di campioni complessi, in quanto, con un'attenta scelta della due fasi, possono trattenere le classi di composti di interesse e allontanare le impurezze con successivi lavaggi oppure viceversa.

Nell'esperienza di laboratorio sono state utilizzate le cartucce SPE ODS-C18 Agilent, che devono essere preventivamente condizionate con la fase mobile scelta, per favorire i processi d'interazione tra i principi attivi e la fase stazionaria.

L'estrazione in fase solida può essere suddivisa in quattro passaggi:



1. **Condizionamento:** prima di procedere con la separazione dei flavonoidi la fase stazionaria viene condizionata con 2 ml di metanolo per aumentare la sua capacità ritentiva e di adsorbimento, poi lavata con 2 ml di acqua distillata. Per facilitare la discesa del solvente si applica una pressione uniforme all'interno della camera della cartuccia, in modo da ottenere un gocciolamento costante di 1 goccia/secondo per impedire la formazione di percorsi preferenziali e per rendere la metodica il più riproducibile possibile (Fig. 53).
2. **Caricamento:** si procede aggiungendo 1 ml di campione glicerinato. I principi attivi formano bande a causa della loro differente velocità di migrazione legata alla loro diversa affinità per i siti di scambio (Fig. 54).
3. **Lavaggio:** viene eseguito aggiungendo due porzioni successive da 2 ml di acqua. Questo passaggio fondamentale, consente di eliminare la glicerina dall'estratto. Durante questa procedura è certa la perdita di una piccola quantità di principi attivi polari, quindi più affini all'acqua, quali ad esempio l'acido caffeico. Tale metodica, pur avendo sostanziali limiti analitici, è l'unica che ci permette la valutazione del contenuto in principi attivi negli estratti idroglicerici, che sarebbero altrimenti impossibili da analizzare.
4. **Eluizione:** effettuata mediante l'aggiunta di due porzioni da 2 ml di metanolo.(Fig. 55, 56).



Fig. 54 - fase di caricamento EGB ed EGC

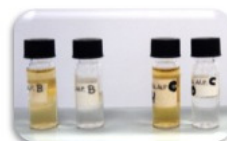


Fig. 56 -EGB ed EGC in acqua e in metanolo a confronto

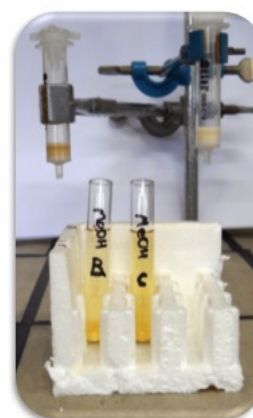


Fig. 55 -EGB ed EGC e in metanolo a confronto

5.3.2 Analisi HPTLC dei flavonoidi

L'analisi è stata svolta sugli estratti idroalcolici EFA ed EFB diluiti 1:10 in etanolo al 50% e sulle frazioni ottenute dallo SPE per quelli idroglicerici EGB ed EGC (Tab. 5).

CAMPIONI	
EFA	EFA 1:10 in etanolo-acqua 50%
EFB	EFB 1:10 in etanolo-acqua 50%
EGB	SPE EGB in metanolo
EGC	SPE EGC in metanolo

Tab. 5- descrizione dei campioni analizzati in HPTLC

Con l'ausilio del depositore automatico CAMAG LINOMAT V, sono stati collocati sulla lastra i quattro campioni in esame e otto standard commerciali riportati anche in letteratura (Schwaiger, 2006) come costituenti della Stella alpina e che verranno usati come riferimento per poter identificare i principali flavonoidi presenti nei campioni. Allo scopo quindi, sono stati depositati: rutina, acido clorogenico, acido caffeico, luteolina, luteolina-7-glucoside, apigenina, apigenina-7-glucoside, isoquercitrina.

Lo sviluppo della lastra deve avvenire in due step, con fasi mobili differenti, che consentano una corsa controllata di flavonoidi sia liberi che glicosilati.

Pertanto, a deposizione terminata, la lastra è stata posta all'interno della prima camera di sviluppo cromatografico, preparata con fase mobile: etile acetato, acido formico, acido acetico, acqua (100:11:11:20) (Wagner, 2009). Quando il fronte del primo eluente ha raggiunto la metà della lastra (5 cm), questa è stata estratta dalla vaschetta e lasciata ad asciugare sotto cappa. In seguito la lastra è stata posta all'interno della seconda camera di sviluppo cromatografico, preparata con fase mobile: toluene, etilacetato, acido acetico (100:90:10) eluita fino a 9 cm ed asciugata sotto cappa (Fig. 57).

1° STEP	<ul style="list-style-type: none">• Eluente: etile acetato, acido formico, acido acetico, acqua (100:11:11:20)• Corsa del solvente: 5 cm
2° STEP	<ul style="list-style-type: none">• Eluente: toluene, etilacetato, acido acetico (100:90:10)• Corsa del solvente: 9 cm

Fig. 57- schema descrittivo dello sviluppo della lastra

La lastra è stata osservata agli UV a 254 nm e poi derivatizzata in modo tale da permettere la visualizzazione dei flavonoidi agli UV a 366 nm. A tale scopo, la lastra è stata nebulizzata prima con una soluzione di difenilborilossietilamina (NP) 1% in metanolo e in seguito con una soluzione di polietilenglicole-4000 (PEG) 5% in etanolo (Wagner, 2009). Dopo derivatizzazione sono visibili i flavonoidi con una vasta gamma di tonalità, dal giallo all'arancio e al verde, e gli acidi fenolici di colore verde-azzurro. L'identificazione qualitativa delle bande ottenute avviene attraverso la valutazione del fattore di ritenzione (R_f , che corrisponde al rapporto tra la distanza percorsa dalla sostanza e la distanza percorsa dal solvente), oltre che della corrispondenza di colore degli standard con quelli delle bande ottenute dalla separazione cromatografica dei campioni alle stesse condizioni (Fig. 58).

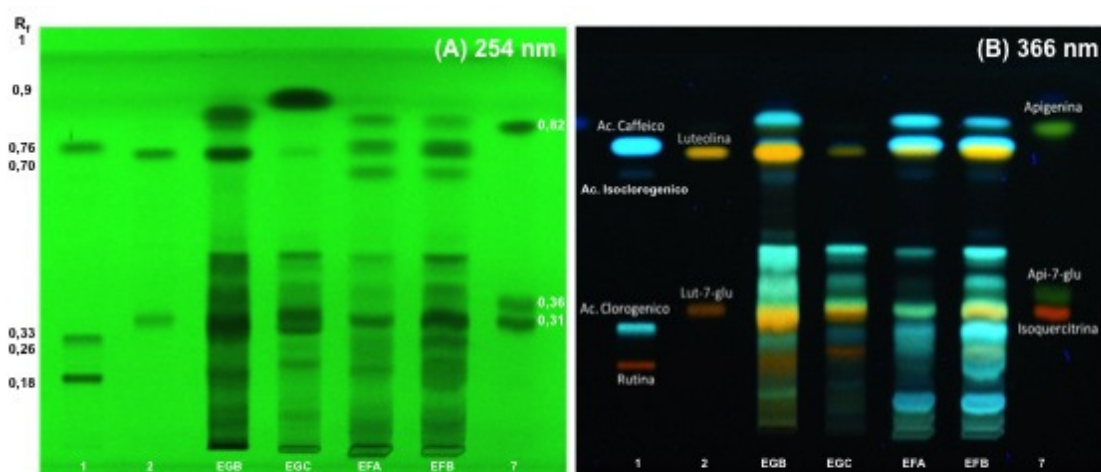


Fig. 58 - lastra HPTLC osservata: a 254nm (A), e a 366nm dopo derivatizzazione (B)

Legenda:

1) Rutina + Ac. Clorogenico + Ac.caffaico	(3 µl cad.)
2) Luteolina 7'-O- glucoside + Luteolina	(3 µl cad.)
3) EGB da SPE	(50 µl)
4) EGC da SPE	(50 µl)
5) EFA 1:10	(25 µl)
6) EFB 1:10	(25 µl)
7) Isoquercitrina + Apigenina 7'-O- glucoside + Apigenina	(3 µl cad.)

5.3.3 Elaborazione dei dati ottenuti dall'analisi HPTLC dei flavonoidi

La valutazione dei campioni esaminati prevede una comparazione visiva con gli standard commerciali e il confronto del valore del fattore di ritenzione R_f riportato in letteratura per tali sostanze. Ciò ha consentito di individuare i polifenoli principali presenti negli estratti e di conseguenza è stato possibile esprimere un giudizio sulla qualità dei campioni, nonché delle droghe di partenza e dei metodi di lavorazione a cui sono state sottoposte.

- Gli estratti di stella alpina presentano tra i principi attivi una notevole varietà di acidi fenolici, come riportato anche in letteratura, presenti nella lastra cromatografica come macchie azzurre dopo derivatizzazione a 366nm; sono identificabili, per confronto con gli standard, gli acidi caffeico, clorogenico e isoclorogenico, oltre ad altri non identificati.
- In letteratura è riportata la presenza dell'acido leontopodico tra i componenti polifenolici principali, individuabile probabilmente nella banda a R_f 0,1: l'identificazione sicura di tale composto, non essendo commerciale lo standard di riferimento, richiede ulteriori analisi di tipo strutturale che prevedono tra l'altro l'isolamento del principio attivo in quantità sufficienti.
- La letteratura indica inoltre tra i composti flavonoidici la presenza di apigenina, apigenina-7-glucoside e rutina, la cui individuazione in questi estratti è minima e comunque poco visibile con questo tipo d'indagine poiché le relative bande possono essere coperte da altre più evidenti dovute a principi attivi presenti in quantità maggiore. E' invece evidente la presenza di luteolina e luteolina-7-glucoside, sia negli estratti fluidi sia in quelli idroglicerici.
- I due estratti fluidi "EFA" ed "EFB" presentano un profilo cromatografico simile nella composizione in acidi fenolici, anche se meno intensi nel campione "EFA"; la presenza di flavonoidi risulta invece molto più evidente in "EFB" rispetto al campione "EFA".
- I campioni idroglicerici, come già descritto, hanno subito un'estrazione SPE, in seguito alla quale, da prove eseguite in parallelo, si verifica una "diminuzione" di una frazione di acidi fenolici: in particolare dal confronto di "EFB" (non estratto) con "EGB" (estratto con SPE) si può notare una minor presenza di acido caffeico e degli acidi fenolici a R_f 0,1 ÷ 0,3 nel campione "EGB".

- Dal confronto tra i campioni idroglicerici di Agripharma “EGB” e del competitor “EGC”, estratti con la stessa metodica SPE, si può osservare come, sebbene presentino un analogo profilo fitochimico, l’intensità dei singoli principi attivi è maggiore nel campione “EGB” rispetto ad “EGC”. Questo tipo di analisi, pur non potendosi ritenere “quantitativa”, può comunque dare indicazioni di questo tipo in ragione del confronto tra l’intensità cromatica delle bande (direttamente proporzionale alla quantità di composto) nei due campioni, permettendoci di ipotizzare una migliore qualità dell’estratto Agripharma “EGB” rispetto a quello del competitor “EGC” a parità di quantità di campione depositato sulla lastra.
- È comunque interessante osservare come l’estratto ottenuto dal competitor “EGC” presenta a 254nm un’intensa banda a R_f 0,9, assente invece negli estratti Agripharma. L’identificazione di tale componente non è possibile con questa tecnica, ma si richiede l’impiego di analisi strutturali più approfondite; in ogni caso si può comunque considerare che il composto è poco polare, con una struttura probabilmente aromatica e non polifenolica, poiché non è visibile a 366nm, non forma complessi colorati con il derivatizzante e non è un conservante ad azione antiossidante.

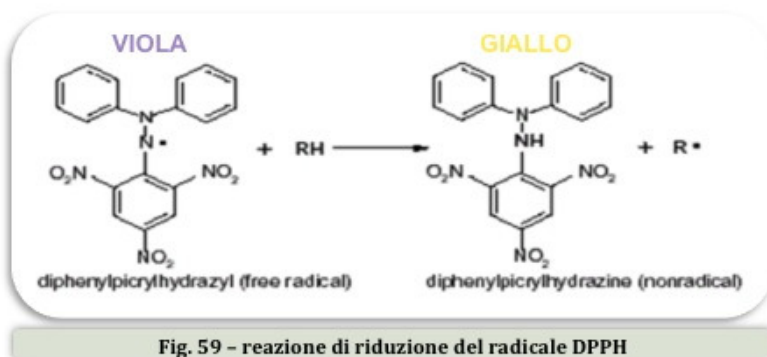
5.4 Valutazione dell’attività antiossidante

La determinazione dell’attività antiossidante di un fitocomplesso o di un principio attivo è un’operazione complessa sul piano operativo ed interpretativo. Sono numerosi i test *in vitro*, *in vivo* e strumentali utilizzabili per determinare tale attività, ciascuno dei quali è in grado di rivelare una particolare singolarità di un’espressione biologica spesso varia nei suoi meccanismi biochimici. Le valutazioni sull’attività antiossidante sono state eseguite sui campioni di estratto fluido (EFA ed EFB) e sui campioni di estratto idroglicerico (EGB ed EGC) di *Leontopodium alpinum* attraverso il metodo spettrofotometrico classico e HPTLC bioautografico. Le analisi sono state svolte utilizzando i radicali DPPH• (1,1-difenil-2-picrilidrazile) e ABTS•+ [2,2’-diazino (3-etilbenzotiazolino-6solfonato)]. La valutazione dell’attività antiossidante è giustificata innanzitutto dalla composizione fitochimica della droga, analizzata in precedenza, la quale è caratterizzata da polifenoli che, com’è noto da letteratura, presentano attività antiossidante (Giovannini *et al.*, 2006). Inoltre, data la mancanza di dati di letteratura riguardanti tale pianta, si è voluto approfondire quest’aspetto di bioattività.

Utilizzando il metodo spettrofotometrico classico si sono potute determinare le attività antiossidanti degli interi fitocomplessi, compresi i prodotti idroglicerici, poiché in tale analisi la presenza di glicerina non costituisce un'interferenza, a differenza della determinazione antiossidante per via cromatografica in cui è stata necessaria l'estrazione con SPE nei campioni "EGB" ed "EGC" proprio per rimuovere la glicerina.

5.4.1 Metodo spettrofotometrico con DPPH

Il test DPPH è una delle metodiche più semplici e veloci per la valutazione del potere antiossidante (Poli *et al.*, 2003). Esso prevede la riduzione del radicale cromoforo stabile DPPH• in presenza di composti antiossidanti. La reazione che avviene è la donazione di un idrogeno dall'antiossidante R-H al DPPH, quindi la formazione del rispettivo composto non radicalico DPPH-H. Il radicale DPPH• è di colore viola; l'aggiunta di un agente antiossidante ne determina il viraggio al giallo (Fig. 59).



L'attività riducente delle molecole antiossidanti nei confronti del DPPH, è valutata attraverso la misura della diminuzione dell'assorbanza a 517 nm della soluzione di radicale, dopo la reazione con i prodotti da testare. I risultati sono espressi come IC₅₀, ovvero la concentrazione dell'estratto che causa una riduzione del 50% del DPPH• radicalico iniziale.

Trattandosi di un'analisi colorimetrica, per ogni campione è necessario individuare un range entro il quale è possibile valutare al meglio il potere antiossidante. A 2900 µl di una soluzione etanolica di DPPH 1x10⁻⁴ M sono stati aggiunti 100 µl di ciascun campione a diverse concentrazioni (5-10-20-50-100 µl/ml in acqua).

I campioni così ottenuti sono stati posti in agitazione al buio alla velocità di 200 rpm; dopo trenta minuti d'incubazione a temperatura ambiente è stata misurata allo spettrofotometro l'assorbanza di ciascun campione alla lunghezza d'onda di 517 nm.

Come controllo negativo è stata impiegata una soluzione etanolica di DPPH $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ in cui i campioni sono stati sostituiti da un'aliquota corrispondente dell'opportuno solvente (EtOH 50% per i campioni idroalcolici e glicerina 50% per i campioni idroglicerici). L'attività antiossidante è stata calcolata in base alla diminuzione di assorbanza che si osserva in seguito alla cattura del radicale; più precisamente come percentuale d'inibizione della formazione del radicale DPPH secondo la seguente equazione:

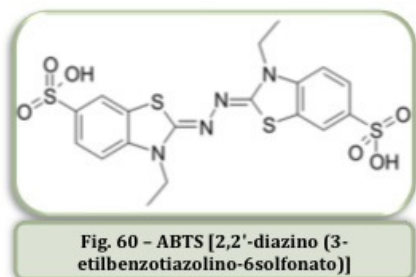
$$\% \text{ INIBIZIONE} = [1 - (A_A/A_B)] \times 100$$

Dove:

- A_A rappresenta l'assorbanza del DPPH con i campioni;
- A_B rappresenta l'assorbanza del DPPH senza i campioni.

I risultati sono espressi come IC_{50} , cioè la concentrazione, in $\mu\text{l/ml}$, necessaria per inibire il 50% di formazione del radicale DPPH•.

5.4.2 Metodo spettrofotometrico con ABTS



Il catione $ABTS^{\bullet+}$ (Fig. 60) viene prodotto facendo reagire una soluzione 2 mM di ABTS (0,011g/10 ml di acqua distillata) con 100 μl di una soluzione 70 mM di $K_2S_2O_8$ (0,0946 g in 5 ml di acqua distillata), tenendo la miscela al buio per 16 ore. Prima di eseguire l'analisi è necessario azzerare lo

spettrofotometro a 734 nm con un tampone fosfato (PBS) 5 mM a pH 7,4 e diluire 1 ml della soluzione di $ABTS^{\bullet+}$ con circa 25 ml dello stesso tampone, fino ad ottenere un'assorbanza pari a $0,7 \pm 0,02$. Sono state preparate differenti diluizioni di ciascun campione a diverse concentrazioni. I campioni per l'analisi sono stati preparati in cuvetta miscelando 10 μl di ogni diluizione con 990 μl di $ABTS^{\bullet+}$, mentre nel bianco, al posto del campione, sono stati aggiunti 10 μl di etanolo per gli estratti idroalcolici oppure 10 μl di glicerina al 50% per gli estratti idroglicerici. E' stata quindi letta sullo strumento l'assorbanza di ogni campione dopo un minuto esatto dall'aggiunta del radicale. La percentuale d'inibizione del radicale $ABTS^{\bullet+}$ è calcolata con l'equazione:

$$\% \text{ INIBIZIONE} = [1 - (A_A/A_B)] \times 100$$

Dove:

- A_A rappresenta l'assorbanza dell'ABTS \bullet^+ con l'estratto;
- A_B rappresenta l'assorbanza del solo ABTS \bullet^+ .

Dalla curva per interpolazione si determina l' IC_{50} .

Si sono quindi determinate le IC_{50} , cioè le concentrazioni di estratto in grado di esprimere il 50% della totalità dell'attività antiossidante: secondo questa modalità di espressione del dato, i risultati espressi in Tabella 6 vanno letti come "ad un minore valore riportato, corrisponde una maggiore attività antiossidante". L'attività antiossidante espressa come IC_{50} valutata con il metodo DPPH e ABTS è espressa anche nel Grafico 1.

Campione	DPPH	ABTS
	IC_{50} (μ l estratto/ml)	
EFA	0,511 \pm 0,026	0,121 \pm 0,0059
EFB	0,423 \pm 0,020	0,110 \pm 0,0055
EGB	0,218 \pm 0,011	0,084 \pm 0,0041
EGC	1,309 \pm 0,069	0,5476 \pm 0,023

Tab. 6- attività antiossidante espressa come IC_{50} valutata con il metodo DPPH e ABTS

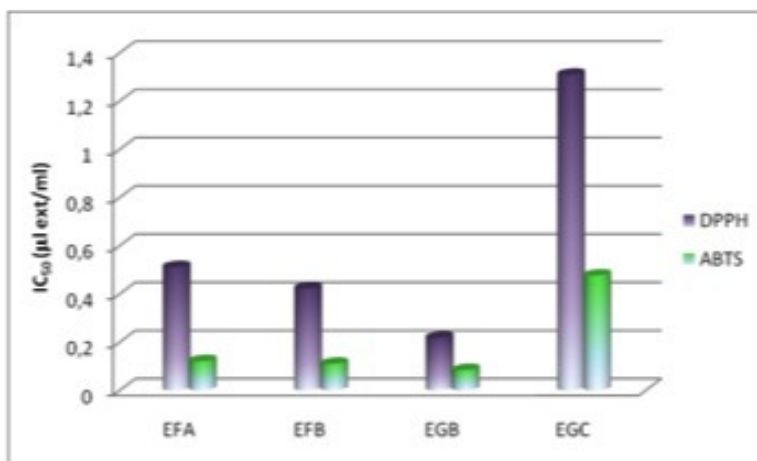


Grafico 1 -attività antiossidante espressa come IC_{50} valutata con il metodo DPPH e ABTS

Dai dati ottenuti si può dedurre che:

- i due estratti fluidi presentano, con entrambi i test, attività confrontabili tra loro, anche se “EFB” ha attività leggermente superiore ad “EFA”;
- l’estratto idroglicerico “EGB” dimostra la migliore attività antiossidante, mentre l’estratto del competitor “EGC” risulta essere il prodotto meno attivo, con una capacità antiradicalica circa 6 volte meno intensa rispetto ad “EGB” in entrambi i test;
- tale risultato era sostanzialmente atteso, dal momento che conferma la stretta correlazione tra il contenuto in polifenoli (acidi fenolici e flavonoidi) valutati via HPTLC e l’attività antiossidante espressa dai fitocomplessi.

5.4.3 Metodo HPTLC bioautografico con ABTS e DPPH

Per valutare in modo più specifico l’attività antiossidante dei composti che caratterizzano i due campioni analizzati, sono stati condotti saggi con i radicali ABTS^{•+} e DPPH[•] direttamente su lastre HPTLC. Lo scopo era di valutare la capacità dei singoli componenti del fitocomplesso di decolorare le soluzioni di DPPH[•] e ABTS^{•+}, che si presentano rispettivamente di colore viola e verde. Tale metodo prevede la preparazione e l’eluizione di due lastre HPTLC identiche tra loro, come già descritto nel paragrafo 5.3.2, successivamente derivatizzate, una con una soluzione etanolica di DPPH[•] 0,2%, e l’altra con una soluzione acquosa di ABTS^{•+} preparata come per il metodo spettrofotometrico (soluzione stock). L’attività dei singoli componenti del fitocomplesso è stata monitorata subito dopo l’aggiunta del radicale. (Figura 61 relativa ai test compiuti).

Dalla figura 61 emerge che i principi attivi caratterizzanti i campioni di stella alpina, e già descritti nel paragrafo precedente, sono risultati i maggiori responsabili dell’attività antiossidante; in particolare si può osservare come l’estratto “EGB” dimostri un’attività antiossidante superiore all’estratto “EGC” del competitor con entrambi i radicali, e l’estratto da campione “EFB” ha attività maggiore di “EFA”, in linea con il maggior contenuto in principi attivi come già osservato in precedenza. Si osserva inoltre come la banda a R_f 0,9 presente nel campione “EGC” del competitor non abbia attività antiossidante e che quindi sia plausibile escludere nel campione la presenza di un componente aggiunto con funzione conservante.

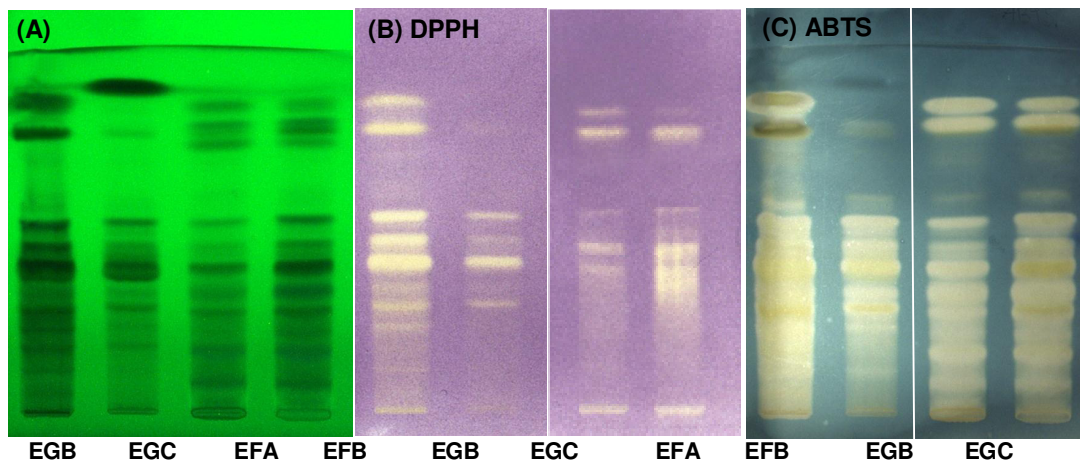


Fig. 61- lastra HPTLC osservata a 254 nm (A) e derivatizzata con DPPH (B) e ABTS (C)

Legenda:

- | | |
|---------------|--------------|
| 1) EGB da SPE | (50 μ l) |
| 2) EGC da SPE | (50 μ l) |
| 3) EFA 1:10 | (25 μ l) |
| 4) EFB 1:10 | (25 μ l) |
-

5.5 Discussione dei risultati

Dalle analisi svolte, atte a misurare la presenza dei principi attivi caratterizzanti e a valutare l'attività antiossidante, è emerso che i campioni EFA, EFB ed EGB, forniti da Aghripharma, presentano un profilo d'impiego salutistico migliore rispetto al campione EGC, fornito dal Competitor. Il metodo di analisi HPTLC ha reso evidente, infatti, che EFA, EFB ed EGB, in seguito a confronto con sostanze standard (rutina, acido clorogenico, acido caffeico, luteolina, luteolina-7-glucoside, apigenina, apigenina-7-glucoside, isoquercitrina) attribuite alla Stella alpina in letteratura, possiedono una maggiore varietà di flavonoidi caratterizzanti. In particolare i due estratti fluidi EFA ed EFB presentano un profilo cromatografico simile nella composizione in acidi fenolici, ma la presenza di flavonoidi è più evidente in EFB rispetto al campione EFA. Per quanto riguarda invece gli estratti idroglicerici (estratti con SPE), dal confronto si può notare che sebbene presentino un analogo profilo fitochimico, l'intensità dei singoli principi attivi è maggiore nel campione EGB rispetto ad EGC. Tali considerazioni sono poi

supportate anche dall'analisi spettrofotometrica e dal metodo HPTLC bioautografico con ABTS e DPPH, eseguiti per valutare l'attività antiossidante.

Dai dati ottenuti si può quindi dedurre che i due estratti fluidi presentano attività confrontabili tra loro, anche se EFB ha attività leggermente superiore ad EFA. Mentre per quanto riguarda gli estratti idroglicerici, EGB dimostra in assoluto la migliore attività antiossidante, mentre l'estratto del competitor EGC è il prodotto meno attivo, con una capacità antiradicalica circa 6 volte meno intensa rispetto ad EGB, come si può notare dai dati rilevati dalle analisi spettrofotometriche. Viene quindi confermata la stretta correlazione tra il contenuto in polifenoli valutati via HPTLC e l'attività antiossidante espressa dai fitocomplessi.

Il miglior profilo d'identità fitochimica e funzionale degli estratti EFA, EFB ed EGB è probabilmente dovuto, oltre che all'elevata qualità della droga, **fattore influenzato da tecniche di coltivazione mirate presso l'azienda agricola florovivaistica "Olga Casanova"**, anche alle successive metodiche di lavorazione messe in pratica presso Agripharma. È infatti noto che fattori artificiali o tecnici quali la raccolta, la preparazione e conservazione, influenzano la qualità delle piante medicinali e delle droghe.

Si deve inoltre sottolineare, che gli estratti EFA, EFB ed EGB, sono stati ottenuti da pianta fresca.

Infine, il tempo balsamico indicato per il campione "B" rispetto ad "A" è più idoneo per l'ottenimento di una droga di qualità superiore. Ciò va a evidenziare l'importanza del momento della raccolta della pianta officinale, fattore da non sottovalutare al fine di ottenere un prodotto estremamente completo e ricco dal punto di vista fitochimico.

Conclusioni

La Stella alpina, conosciuta comunemente anche con il nome di Edelweiss, è il simbolo floreale delle Alpi. Diverse sono le leggende alpine popolari legate a questo fiore, emblema di alto e nobile coraggio ma anche di puro ed immacolato candore. Oggi, come allora, se ne contempla la bellezza e si cominciano a conoscere proprietà salutistiche molto apprezzabili. Con questo lavoro di tesi ho voluto descrivere la specie *Leontopodium alpinum*, offrendo una panoramica completa di quello che è il suo profilo botanico-farmacognostico, del percorso della pianta dalla coltivazione all'ottenimento della droga, al profilo fitochimico nonché il suo utilizzo in campo salutistico.

La smodata ricerca, in passato, di questa popolare pianta ne ha resa necessaria oggi la salvaguardia mediante precise disposizioni legislative che vietano la raccolta della pianta spontanea. Diventa quindi la coltivazione di Stella alpina, l'unico modo per l'approvvigionamento di tale droga e per beneficiare dei molteplici aspetti salutistici che presenta.

Nella medicina popolare gli estratti di stella alpina sono utilizzati per la cura di bronchite acuta, tonsillite, emottisi, dolori addominali, enteriti, gastriti, dissenteria e febbre. Gli usi moderni di questa pianta, basati su studi scientifici ancora in via di approfondimento, la vedono invece protagonista soprattutto in campo cosmetico nella composizione di formulazioni anti-age, giustificato dall'elevato contenuto in sostanze antiossidanti.

Nel mio lavoro di tesi è stata proposta una parte professionalizzante riguardante l'accertamento d'identità e qualità farmacognostica della Stella alpina. Ho applicato nei laboratori di Botanica Applicata, del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, alcune tecniche d'indagine sulla droga *Leontopodium alpinum* infiorescenze ed estratti da essa ricavati. Sulla droga si è operato un controllo d'identità anatomico-macroscopico e microscopica, mentre sugli estratti è stata fatta una valutazione qualitativa dei principi attivi caratterizzanti (flavonoidi) mediante HPTLC seguendo la letteratura scientifica correlata (Wagner, 2009), Inoltre è stata effettuata una valutazione dell'attività antiossidante tramite il metodo spettrofotometrico classico e HPTLC utilizzando i radicali DPPH• e ABTS•⁺ (Guerrini *et al.*, 2011).

L'importante attività antiossidante della Stella alpina, rilevata mediante queste tecniche d'indagine, suggerisce la possibilità di un impiego più vasto rispetto all'attuale, che può

portare sicuramente ad un allargamento dei nuovi mercati erboristici, dietetici e cosmetici.

Attraverso questo approccio professionalizzante ho potuto quindi mettere in pratica alcune strategie d'indagine farmacognostica di qualità della droga e approfondire aspetti analitici e funzionali di estratti. Questo mi ha permesso di esplorare aspetti della realtà professionale del farmacista correlati alla responsabilità tecnica nell'accertamento della qualità di droghe ad uso salutistico.

Bibliografia

- Aeschimann D., Lauber K., Moser D.M., Theurillat J-P., *Flora Alpina*, Zanichelli, 2004
- Bosellini A., *Dagli oceani perduti agli ammassi stellari*, Italo Bovolenta editore, 1991
- Bruni A., *Farmacognosia Generale e Applicata*; Piccin Ed., 1999
- Bruni A., Nicoletti M., *Dizionario ragionato di erboristeria e di fitoterapia*, Piccin Ed., 2003
- Campanini E., *Dizionario di fitoterapia e piante medicinali*, Tecniche nuove, 2004
- Campbell. N.A., *Principi di biologia*, Zanichelli, 1998
- Capasso F., Grandolini G., Izzo A. A. *Fitoterapia*, Springer, 2009
- Cicek S.S., Untersulzner C., Schwaiger S., Zidorn C., *Caffeoyl-D-Glucaric acid derivatives in the Genus Gnaphalium (Asteraceae: Gnaphalieae)*, Record of Natural Products, 2012
- Chiereghin P., *Farmacia Verde*, Edagricole, 2011
- Costa S., Schwaiger S., Cervellati R., Stuppner H., Speroni E., Guerra M.L., *In vitro evaluation of the chemoprotective action mechanism of leontopodic acid against aflatoxin B1 and deoxynivalenol-induced cell damage*, Journal of Applied Toxicology, 2008
- Cozzi R., Protti P., Ruaro T., *Elementi di analisi chimica strumentale*, Zanichelli, 1998
- Cuvelier E. (1997) *Molécules antioxydantes relations structure-activité*. Publié lors des 16èmes Journées Internationales Huiles Essentielles de DIGNE les BAINS, 201-211.
- Della Beffa M.T., *Fiori di montagna*, Istituto Geografico De Agostini, 2001
- Dweck, A. C., A review of Edelweiss, SOFW Journal, 2004
- Dobner J., Schwaiger S., Jenewein I.H., Stuppner H., *Antibacterial activity of Leontopodium alpinum (Edelweiss)*, Journal of Ethno-Pharmacology, 2003
- Fischer F., Zufferey E., Bourgeois JM., Heritier J., Micaux F., *UV-ABC screen of luteolin derivatives compared to edelweiss extract*, Journal of Photochemistry and Photobiology, 2011
- Ganzera M., Greifeneder V., Schwaiger S., Stuppner H., *Chemical profiling of Edelweiss (Leontopodium alpinum Cass.) extract by micellar electrokinetic capillary chromatography*, Fitoterapia, 2012
- A. Guerrini, D. Rossi, G. Paganetto, M. Tognolini, M. Muzzoli, C. Romagnoli, F. Antognoni, S. Vertuani, A. Medici, A. Bruni, C. Useli, E. Tamburini, R. Bruni, G. Sacchetti; *Chemical characterization(GC-MS and NMR fingerprinting) and bioactivities of South-African Pelargonium capitatum (L.) L'Herit. (Geraniaceae) essential oil*, Chemistry & Biodiversity, 2011
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990) *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview*. Methods Enzymol. 186: 1-85.
- Harborne J.B. (1989) *Plant phenolics in Methods in plant biochemistry*. Academic Press Harcourt Brace Jovanovich, vol. 1, XII, London
- Lulli D., Potapovich A., Maurelli R., Dellambra E., Pressi G., Kostyuk V., Dal Toso R., De Luca C., Pastore S., Korkina L., *Anti- infiammatori effects of concentrated ethanol extract of Edelweiss*

(Leontopodium alpinum Cass) callus cultures toward human keratinocytes and endothelial cell, Hindawi Publishing Corporation Mediator of Inflammation, 2012

- Morelli I, Flamini G, Pistelli L, "Manuale dell'erborista – biosintesi, estrazione e identificazione delle sostanze di origine vegetale", 2006
- Musmarra A, *Dizionario di botanica*, Edagricole, 1996
- Peroni G., *Driope, ovvero il patto tra l'uomo e la natura - Trattato di fitoterapia*, Nuova Ipsa, 2012
- Peyronel B., Dal Vesco G., *Effetti dello spopolamento della montagna sulla vegetazione: osservazioni su campi abbandonati in Val di Cogne (Aosta) Estr. da: Bulletin / Société de la flore Valdôtaine*, 1973
- Pignatti S., *Flora d'Italia* (3 volume), Edagricole, 1982
- Poli F., Muzzoli M., Sacchetti G., Tassinato G., Lazzarin E., Bruni A., *Antioxidant activity of supercritical CO₂ extracts of helichrysum italicum*, Pharmaceutical Biology, 2003.
- Ponzio P., *Stella alpina: la regina della bellezza*, Kosmetica, 2009
- Prevedello M., Vertuani S., Besco E., Ziosi P., Manfredini S., *Estratto di Leontopodium alpinum Cass.: capacità antiossidante di formulazioni cosmetiche*, L'Erborista, 2004
- Prevedello M., *Cosmetologia, guida visuale*, Tecniche nuove, 2005
- Reisinger H., Keller R., *Fiori e ambienti delle Alpi*, Arti Grafiche Saturnia – Trento 1990
- Rigano L., Boncompagni E., Giogli A., Occhionero G., *Sostanze vegetali in cosmesi*, Aboca 2003
- Safer S., Cicek S., Pieri V., Schwaiger S., Schneider P., Wissemann V., Stuppner H., *Metabolic fingerprinting of Leontopodium alpinum species (Asteraceae) by means of H NMR and HPLC-ESI-MS*, Phytochemistry, 2011
- Savelli F., Bruno O. *Analisi chimico farmaceutica*, Piccin, 2005
- Schwaiger S., Cervellati R., Seger C., *Leontopodic acid - a novel highly substituted glucaric acid derivative from Edelweiss (Leontopodium alpinum Cass.) and its antioxidative and DNA protecting properties*, Tetrahedron, 2005
- Schwaiger S., Seger C., Wiesbauer B., Schneider P., Ellmerer E.P., Sturm S., Stuppner H., *Development of an HPLC-PAD-MS assay for the identification and quantification of major phenolic Edelweiss (Leontopodium alpinum Cass.) constituent*, Phytochemical Analysis, 2006
- Strasburger E., Pirola A., Bagni N., Lausi D., Pupillo P., *Trattato di botanica*, Antonio Delfino Editore, 1986
- Vigneron J.P., Rassart M., Vertesy Z., *Optical structure and function of the white filamentary hair covering the edelweiss bracts*, Los Alamos National Laboratory, Preprint Archive, Physics 2007
- Vouillamoz J., Carron C.A., Baroffio C.A., Carlen C., *Leontopodium alpinum Cass. "Helvetia", a new hybrid edelweiss*, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines, 2008
- Wagner H., Bladt S., *Plant drug analysis*, Springer Ed., 2009
- www.actaplantarum.org
- www.boga.ruhr-unibochum.de
- www.claudiopia.it
- www.erbe.altervista.org
- www.flickr.com

- www.regione.piemonte.it
- www.vivaiPriola.it
- commons.wikimedia.org
- De.wikipedia.org
- Flora.uniud.it
- Fr.wikipedia.org
- It.wikipedia.org
- Physicianswholisten.blogspot.com
- Thebiggestplantdictionary.blogspot.com

