

# UNIVERSITÀ DEGLISTUDI DI FERRARA DIPARTIMENTO di BIOLOGIA ed EVOLUZIONE Sezione di Risorse Agrotecnologiche e Farmaceutiche Carao Errolo I d'Esta 22 44100 Entrara



Corso Ercole I d'Este, 32 - 44100 Ferrara Tel. (0532) 293700 - Fax (0532) 208561

Ferrara, 22/10/2012

## "Caratterizzazione di estratti della pianta officinale Stella alpina (*Leontopodium alpinum*), al fine di verificare la qualità dei principi attivi caratterizzanti e qualificanti sul piano salutistico"

## Oggetto: preparati a base di Stella alpina.

1.	Introduzione	pag. 2
2.	Analisi HPTLC dei flavonoidi	pag. 3
3.	Approfondimenti funzionali	
	Valutazione dell'attività antiossidante su HPTLC	pag. 4
	Analisi spettrofotometrica dell'attività antiossidant	e pag. 7
4.	Conclusioni	pag. 8
Re	esponsabili scientifici	Responsabile tecnico
Prof. Gianni Sacchetti		Dott.ssa Silvia Maietti
Do	ott. Damiano Rossi	

## 1. Introduzione

I campioni di stella alpina (*Le ontopodium alpinum* Cass.) forniti dalla ditta Agripharma erano:

- estratto fluido Casanova "A" (lotto EF 5924): EFA
- estratto fluido Casanova "B" (lotto EF 5926): EFB
- estratto idroglicerico Casanova "B" (lotto GE 1340): EGB
- estratto idroglicerico Competitor: EGC

Lo studio è stato finalizzato ai seguenti obiettivi:

- controllo dei campioni secondo dati di letteratura relativamente alla presenza di principi attivi caratterizzanti;
- approfondimento funzionale (attività antiossidante) dei campioni.

#### Nota:

- I campioni di estratto fluido sono stati preventivamente diluiti 1:10 con etanolo al 50%; la diluizione in alcol puro provoca la precipitazione di una frazione che indica la presenza di una componente zuccherina in discreta quantità.
- 2. Per gli estratti idroglicerici si è proceduto con 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.

## 2. Analisi HPTLC dei flavonoidi

L'analisi cromatografica su strato sottile ad elevate prestazioni (High Performance Thin Layer Chromatography) è stata svolta utilizzando apposite lastre che permettono di definire ed evidenziare con maggiore dettaglio i componenti caratteristici e peculiari presenti nei prodotti a base di Stella alpina.

La caratterizzazione della Stella alpina e dei prodotti derivati, non essendo presente in alcuna Farmacopea Ufficiale, è stata condotta basandosi sulla letteratura scientifica internazionale, che descrive come peculiare la presenza di acidi fenolici e di alcuni flavonoidi, in particolare acido caffeico e clorogenico, apigenina e luteolina e loro glicosilati [1-4]. L'identificazione è stata effettuata per confronto con standard puri commerciali (Fluka ed Extrasynthese).

In **figura 1** è possibile distinguere le corse cromatografiche dei campioni in esame e degli standard di riferimento.

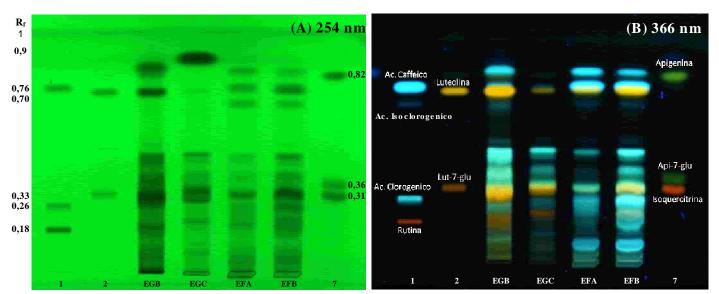


Figura 1 – Lastra HPTLC osservata: a 254nm (A) e a 366 nm, dopo derivatizzazione (B).

#### Legenda:

1)	Rutina + Ac.Clorogenico + Ac. Caffeico	(3µg cad.)
2)	Luteolina-7-glucoside + Luteolina	(3µg cad.)
3)	EGB da SPE	(50µl)
4)	EGC da SPE	(50µl)
5)	EFA 1:10	(25µl)
6)	EFB 1:10	(25µl)
7)	Isoquercitrina + Anigenina-7-glucoside + Anigenina	(3ug cad)

#### Ris ultati analis i HPTLC de i flavono id i

- Gli estratti di stella alpina presentano tra i principi attivi una notevole varietà di acidi
  fenolici, come riportato anche in letteratura [1-4], 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<sub>f</sub> 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 di 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 che 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<sub>f</sub> 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.
- Risulta comunque interessante osservare come l'estratto ottenuto dal competitor "EGC" presenta a 254nm un'intensa banda a R<sub>f</sub> 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, come si riporta di seguito in figura 2.

## 3. Approfondimenti funzionali

#### Valutazione dell'attività antios sidante su HPTLC

La capacità antiossidante è stata studiata su lastra HPTLC per mettere in correlazione l'attività osservata con i diversi componenti del fitocomplesso (figura 2) nei confronti di due radicali, DPPH– e ABTS<sup>+-</sup>, comunemente utilizzati per la valutazione dell'attività antiradicalica *in vitro*.

L'attività viene valutata sulla base della colorazione più chiara ed evidente delle bande; i composti maggiormente attivi appaiono perciò più chiari e, a parità di concentrazione, l'intensità delle macchie è direttamente proporzionale ad una più spiccata attività delle categorie chimiche corrispondenti.

L'eluizione degli estratti di stella alpina è stata eseguita come descritto nel paragrafo precedente: le lastre sono poi state trattate con opportune soluzioni di radicale e osservate in luce visibile.

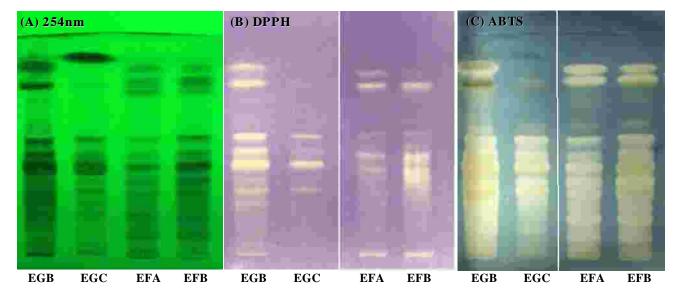


Figura 2 - Lastra HPTLC osservata: a 254nm (A) e derivatizzata con DPPH (B) e ABTS (C).

#### Legenda:

1)	EGB da SPE	(50μl)
2)	EGC da SPE	(50µl)
3)	EFA 1:10	(25µl)
4)	EFB 1:10	(25µl)

Dalla figura 2 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<sub>f</sub> 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.

## Analis i spettro foto metrica dell'attività antios sidante

Utilizzando il metodo spettrofotometrico 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.

Si sono quindi determinate le IC<sub>50</sub>, 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 1** vanno letti come "ad un minore valore riportato, corrisponde una maggiore attività antiossidante".

Tabella 1 – Attività antios sidanti degli es tratti fluidi e degli es tratti idoglicerici.

	DPPH	ABTS
Campione	IC <sub>50</sub> ( I estratto/ml)	
EFA	0,511	0,121
EFB	0,423	0,110
EGB	0,218	0,084
EGC	1,309	0,476

## Ris ultati attività antios s id ante:

- i due estratti fluidi presentano, con entrambi i test, attività confrontabili tra loro, anche se "EFB" ha attività leggermente superiore ad "EFA", in linea con quanto già osservato in precedenza (attività antiossidante su HPTLC);
- 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";

 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.

## 4. Conclusioni

- Le analisi per la caratterizzazione dei campioni e l'identificazione dei principi attivi sono state condotte facendo riferimento a dati presenti nella letteratura scientifica [1-4].
- I campioni analizzati presentano un profilo fitochimico qualitativamente simile tra loro, con una forte abbondanza di acidi fenolici, tra cui acido caffeico e clorogenico; sono presenti anche flavonoidi liberi e glicosdilati, quali la luteolina e la luteolina-7glucosoide.
- L'analisi dei due estratti fluidi della Ditta Agripharma ha messo in evidenza che i
  principi attivi sono più abbondanti nel campione "EFB" rispetto ad "EFA", che si
  riflette di conseguenza in un'attività antiossidante leggermente superiore nel caso di
  "EFB".
- L'estratto idroglicerico Agripharma "EGB", confrontato con quello del competitor "EGC", è risultato essere più ricco in principi attivi, tanto da fornire un'attività antiradicalica circa 6 volte superiore rispetto al campione commerciale.
- Il campione "EGC" dall'analisi cromatografia HPTLC presenta un componente invece assente nei campioni Agripharma; la natura di tale composto rimane incognita e la sua determinazione richiede ulteriori indagini.

### Suggerimenti per ulteriori approfondimenti:

- Approfondimento della caratterizzazione chimica dei composti e delle frazioni rimaste non completamente definite.
- Saggi di efficacia su attività differenti rispetto a quella saggiata (es. antimicrobica [2,4,5] anche su ceppi di interesse cosmetico, antifungina, mutageno-protettiva) per dare indicazioni che possano suggerire eventuali nuove proiezioni d'uso degli estratti in nuove formulazioni.

#### Bibliografia

- 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.) constituents", *Phytochemical Analysis*, 2006, 17 (5), 291-298
- 2.Dweck A.C., "A review of Edelweiss", Cosmetics, SOFW-Journal, 2004, 130 (9), 65-68
- 3.Cicek S.S., Untersulzner C., Schwaiger S., Zidorn C., "Caffeoyl-D-glucaric acid derivatives in the genus *Gnaphalium* (Asteraceae: Gnaphalieae)", *Rec. Nat. Prod.*, 2012, 6 (3), 311-315
- 4.Prevedello M., Vertuani S., Besco E., Ziosi P., Manfredini S., "Estratto di *Leontopodium alpinum* Cass.: capacità antiossidante di formulazioni cosmetiche", L'Erborista, maggio-2004.
- 5.Dobner M.J., Schwaiger S., Jenewein I.H., Stuppner H., "Antibacterial activity of *Leontopodium alpinum* (Edelweiss)", *Journal of Ethnophamacology*, **2003**, 89 (2-3), 301-303.