

Pharmanutrition and Functional Foods

TRIMESTRALE DI AGGIORNAMENTO SCIENTIFICO

ORGANO UFFICIALE

SINut
Società Italiana di Nutraceutica

EDITORIALE

Arrigo F.G. Cicero 7

L'importanza di una adeguata valutazione di sicurezza:
il caso dell'estratto di Ginkgo biloba

Salvatore Bianco, Marisa Le Donne, Alfredo Nunziata 8

Erbe e funghi medicinali per il calo ponderale: una panoramica

Michele Antonelli, Davide Donelli 12

Valutazione dell'effetto della supplementazione dietetica con un integratore
combinato a base di frazione polifenolica del bergamotto ed estratto
standardizzato di carciofo sulla modulazione dei livelli di colesterolemia
LDL in soggetti affetti da ipercolesterolemia poligenica

**Arrigo F.G. Cicero, Federica Fogacci, Martina Mezzadri,
Maddalena Veronesi, Elisa Grandi, Claudio Borghi** 18

Sviluppo tecnologico di un acido ialuronico ad ampio spettro
di pesi molecolari e ad alta biodisponibilità

Fabrizio Francomano, Francesco Puoci, Fabio Amone 25

Studio in aperto in condizioni di reale pratica clinica degli effetti
di Aisuricin 1000 mg[®], nutraceutico combinato ad azione ipouricemizzante,
in soggetti adulti affetti da iperuricemia asintomatica

Vincenzo Montemurro, Roberto Pescatori 35

Serenoa Repens e Urtica: caratterizzazione fito-chimica, metodi
di estrazione e requisiti formulativi

Andrea Fratter 41

MISSION

Prima rivista scientifica italiana di nutraceutica, Pharmanutrition and Functional Foods, è pubblicata continuamente dall'inizio del 2016.

La rivista vuole contribuire ad aumentare la cultura della nutraceutica, focalizzata sullo studio degli estratti di piante, animali, minerali e microrganismi, impiegati come nutrienti isolati, supplementi o diete specifiche e in grado di determinare effetti benefici per la salute (che devono essere rigorosamente dimostrati con appropriati studi, sperimentali e clinici), in particolare per la prevenzione e il trattamento delle malattie croniche. È l'organo ufficiale della Società Italiana di Nutraceutica (SINut).

Inoltre, essendo la nutraceutica un campo in piena evoluzione ma relativamente giovane, Pharmanutrition and Functional Foods intende creare un contenitore aperto a segnalazioni preliminari derivati anche da trial clinici pilota di piccole dimensioni, da serie di casi e/o da studi osservazionali.

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

Gli autori sono invitati a:

- * Inviare il testo in formato .doc, .docx fino a un massimo di 10.000 battute (caratteri spazi inclusi) a redazionepharmanutrition@edizioniisnergie.com
 - * Corredare il testo di Titolo, Abstract e Key words in Italiano e Inglese e, quando pertinente, suddividerlo in: Introduzione, Materiali e Metodi, Risultati, Discussione, Conclusione.
 - * Utilizzare le unità di misura nel Sistema Internazionale di unità.
 - * Utilizzare la virgola per separare i numeri decimali.
 - * Enunciare gli acronimi e le abbreviazioni al primo utilizzo.
 - * Redigere l'elenco delle Voci Bibliografiche, inclusi i siti Internet, numerate - tra parentesi tonde, prima del punto - nell'ordine in cui sono citate nel testo, redatte come nell'esempio: Cicero AFG, Fogacci F, Bove M, et al. Short-Term Effects of Dry Extracts of Artichoke and Berberis in Hypercholesterolemic Patients Without Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol.* 2019;123(4):588-591.
-

Pharmanutrition and Functional Foods

Anno IV, N. 4 - Dicembre 2019
TRIMESTRALE DI AGGIORNAMENTO SCIENTIFICO
Registrazione presso Tribunale di Milano N. 93 del 23/03/2016

EDITORE

SINERGIE S.r.l., Edizioni Scientifiche
Via Morimondo, 26 - 20143 Milano
Tel. 02 58118054 - Fax 02 8322004
redazione@edizionisinergie.com - www.edizionisinergie.com

DIRETTORE RESPONSABILE

Mauro Rissa (Milano)

DIRETTORE SCIENTIFICO

Arrigo F.G. Cicero (Bologna)

BOARD SCIENTIFICO

Giovanni B. Agus (Milano)	Federica Fogacci (Bologna)	Massimiliano Ruscica (Milano)
Fabrizio Angelini (Empoli)	Andrea Fratter (Treviso)	Gianni Sagratini (Camerino)
Michela Barichella (Milano)	Luigi Eugenio Iorio (Salerno)	Giovanni Spera (Roma)
Marco Biagi (Siena)	Carlo Maggio (Torino)	Samir Sukkar (Genova)
Claudio Borghi (Bologna)	Alberto Mazza (Rovigo)	Giuliano Tocci (Roma)
Rosa Maria Bruno (Pisa)	Fabrizio Muratori (Como)	Berardino Vaira (Bologna)
Alessandro Colletti (Nizza Monferrato, AT)	Pasquale Perrone Filardi (Napoli)	Gianfranco Vettorello (Udine)
Agostino Consoli (Chieti)	Matteo Pirro (Perugia)	Paolo Vintani (Barlassina, MB)
Sergio Davinelli (Campobasso)	Andrea Poli (Milano)	Roberto Volpe (Roma)
Giovambattista Desideri (L'Aquila)	Manfredi Rizzo (Palermo)	Giovanni Zuliani (Ferrara)

Maciej Banach (Lodz, Polonia)
Amirhossein Sahebkar (Mashhad, Iran)

Laura García-Molina (Granada, ES)

Marco Manca (Maastricht, Paesi Bassi)

SEGRETERIA DI REDAZIONE

SINERGIE S.r.l., Edizioni Scientifiche

IMPAGINAZIONE

SINERGIE S.r.l., Edizioni Scientifiche

STAMPA

Galli Thierry Stampa S.r.l. Via Caviglia, 3 - 20139 Milano

TIRATURA

1.000 copie

Pharmanutrition and Functional Foods

TRIMESTRALE DI AGGIORNAMENTO SCIENTIFICO

EDITORIALE

Arrigo F.G. Cicero 7

L'importanza di una adeguata valutazione di sicurezza:
il caso dell'estratto di Ginkgo biloba

Salvatore Bianco, Marisa Le Donne, Alfredo Nunziata 8

Erbe e funghi medicinali per il calo ponderale: una panoramica

Michele Antonelli, Davide Donelli 12

Valutazione dell'effetto della supplementazione dietetica con un integratore
combinato a base di frazione polifenolica del bergamotto ed estratto
standardizzato di carciofo sulla modulazione dei livelli di colesterolemia
LDL in soggetti affetti da ipercolesterolemia poligenica

**Arrigo F.G. Cicero, Federica Fogacci, Martina Mezzadri,
Maddalena Veronesi, Elisa Grandi, Claudio Borghi** 18

Sviluppo tecnologico di un acido ialuronico ad ampio spettro
di pesi molecolari e ad alta biodisponibilità

Fabrizio Francomano, Francesco Puoci, Fabio Amone 25

Studio in aperto in condizioni di reale pratica clinica degli effetti
di Aisuricin 1000 mg[®], nutraceutico combinato ad azione ipouricemizzante,
in soggetti adulti affetti da iperuricemia asintomatica

Vincenzo Montemurro, Roberto Pescatori 35

Serenoa Repens e Urtica: caratterizzazione fito-chimica, metodi
di estrazione e requisiti formulativi

Andrea Fratter 41

Editoriale

Cari Soci,
eccoci col quarto numero di Pharmanutrition & Functional food del 2019, un anno particolarmente intenso per la nutraceutica. Di particolare interesse è stata la querelle scientifica e legale inerente il riso rosso fermentato, ove in Italia il mercato degli ipocolesterolemizzanti contenenti monacolina K è uno dei principali nel mercato generale dei nutraceutici ed uno di quelli col trend di vendita migliore. Federsalus, SINut e diversi esperti internazionali si sono attivati per interagire con le istituzioni (EFSA, Commissione europea), con redazioni di documenti formali come meta-analisi di safety e documenti di indirizzo (uno dei quali firmato anche dagli esperti della Società Europea di Cardiologia): una prima reazione formale ed importante del mondo accademico ed industriale rispetto a decisioni prese dall'alto. Tuttavia il risultato finale sarà la riduzione drastica del massimo livello di monacolina K contenuto negli integratori ad azione ipocolesterolemizzante. Indubbiamente questo avrà un forte impatto sul controllo della colesterolemia delle decine di migliaia di soggetti che oggi assumono

quotidianamente 10 mg di monacolina K. Volendo vedere la parte più rosea di questa situazione, lo "shock" spingerà le aziende più virtuose ad investire in ricerca e sviluppo e a ricercare formule più innovative. Ma su quali attivi concentrarsi? Sicuramente berberina, estratto secco standardizzato di Carciofo, e frazione polifenolica del bergamotto.

Ricordo a tutti le nostre date più rilevanti per il 2020. Dal 17 al 19 aprile 2020 si terrà a Bologna la nuova versione, altamente interattiva di Nutraceutical Conference by SINut in Cosmofarma, il più grande evento italiano dedicato al mondo farmacia dove SINut organizza un nuovo format educativo intrafieristico. Il congresso nazionale SINut invece si svolgerà per la prima volta nell'Italia nel Sud, a Napoli dal 10 al 12 settembre 2020, con un programma preliminare come sempre denso di contenuti e che accoglierà relatori importanti.

E ora, buona lettura della rivista, che anche in questo numero accoglie articoli di grande interesse per gli esperti di nutraceutica!

Buon Natale e buon 2020 a tutti i soci,

Arrigo F.G. Cicero
Presidente SINut

L'importanza di una adeguata valutazione di sicurezza: il caso dell'estratto di Ginkgo biloba

Salvatore Bianco, Marisa Le Donne, Alfredo Nunziata

AKROS BioScience S.r.l. piazza Aldo Moro 20/d 00071 Pomezia (RM)

ABSTRACT

In the safety assessment of Ginkgo biloba leaf dry extract (GBE), the US National Toxicology Program (NTP) has conducted studies using methods different from those of other Authorities such as EMA and EFSA. While the international and European Authorities have not identified any risk to humans, the NTP reports a potential carcinogenicity of GBE. The drawbacks in the methods of NTP studies reduce the validity of the data. Yet, after the evaluation of the NTP a reduction in the number of publications on Ginkgo biloba and a reduction in the number of clinical trials in Europe were observed. We recommend that the methodology of studies on products of herbal origin be uniform and that these studies be conducted and evaluated by working groups that include pharmacognosy experts and clinicians with experience of products of herbal origin.

Key words: *Ginkgo biloba; toxicity; National Toxicology Program*

SOMMARIO

Nella valutazione di sicurezza dell'estratto secco di foglie di Ginkgo biloba (GBE), il *National Toxicology Program* statunitense (NTP), ha condotto studi con metodi diversi dalle altre Autorità come EMA ed EFSA. Mentre le autorità internazionali ed europee non evidenziano rischi per l'uomo, il NTP denuncia una potenziale cancerogenicità del GBE. I metodi degli studi del NTP presentano criticità che riducono la validità dei dati. Eppure, dopo la valutazione del NTP si è osservata una riduzione del numero di pubblicazioni sul Ginkgo biloba e un ridotto numero di sperimentazioni cliniche in Europa. Raccomandiamo un'uniformità di metodologia degli studi sui prodotti di origine vegetale e che tali studi siano condotti e valutati da gruppi di lavoro che includano esperti di farmacognosia e clinici con esperienza di prodotti di origine vegetale.

Parole chiave: Ginkgo biloba; valutazione di tossicità; National Toxicology Program

INTRODUZIONE

Gli estratti di Ginkgo biloba sono tra i prodotti erboristici più utilizzati a livello mondiale (1). Secondo i dati IMS Health MIDAS, nel 2012 le vendite totali a livello mondiale di prodotti da banco a base di Ginkgo biloba sono state pari a 1,26 miliardi di dollari (US\$). La Cina ha rappresentato il 46% delle vendite (US\$ 578 milioni). Tra gli altri Paesi figurano Germania (US\$ 152 milioni), Australia (US\$ 61 milioni), Francia (US\$ 53 milioni), Brasile (US\$ 48 milioni), Repubblica di Corea (US\$ 40 milioni) e Vietnam (US\$ 37 milioni) (2).

Le Autorità sanitarie europee ed internazionali (OMS, EMA, IARC) hanno studiato la sicurezza dell'estratto secco di foglie di Ginkgo biloba (GBE) senza rilevare rischi per l'uomo (3). La Food and Drug Administration (FDA) invece, sulla base degli studi del *National Toxicology Program* (NTP) ha espresso dubbi sulla sicurezza di tali prodotti. Nonostante serie criticità metodologiche, la valutazione del NTP ha avuto un forte impatto sull'interesse verso il GBE (4).

Nel nostro lavoro esaminiamo le caratteristiche del GBE, le prove effettuate dal NTP, le criticità rilevate dalle altre Autorità Competenti, l'impatto della valutazione del NTP sulle attività scientifiche sul GBE. Esporremo anche una nostra proposta per migliorare il livello della valutazione tossicologica dei preparati vegetali.

MATERIALI E METODI

Abbiamo ricercato i risultati delle prove effettuate dal NTP, e le controdeduzioni delle principali Autorità, valutando i report degli studi ove disponibili. Abbiamo poi valutato l'impatto dei risultati del NTP sull'interesse verso l'estratto di GBE. L'ipotesi è che una valutazione di

possibile tossicità, riducendo l'interesse industriale di una sostanza riduca anche il numero di ricerche svolte, sia per una minor disponibilità dei fondi degli sponsor industriali, che per un minore interesse clinico. Abbiamo ricercato i lavori apparsi su PubMed con la parola chiave "Ginkgo biloba extract" e i lavori apparsi con la parola chiave "herbal medicines" per un confronto con le pubblicazioni in generale su prodotti medicinali di origine erboristica. Abbiamo considerato gli anni immediatamente precedenti (2006-2011) e successivi (2012-2017) alla valutazione del NTP. Per verificare l'impatto sull'interesse dei ricercatori dei Paesi occidentali abbiamo considerato la sede degli studi in corso registrati su clinicaltrials.gov con la parola chiave "Ginkgo biloba extract" e paragonato la situazione agli anni 2006-2011.

RISULTATI

Caratterizzazione del GBE

Il GBE è descritto dalla Farmacopea europea, secondo la quale i costituenti principali sono "flavoni glicosidi" (totale 22,0-27,0%), rappresentati da quercetina, caemferolo, isoramnetina e lattoni terpenici (totale 5,0-7,0%), rappresentati da ginkgolidi A, B, C (2,8-3,4%) e bilobalide (2,6-3,2%). Il contenuto di acidi ginkgolici deve essere ≤ 5 ppm. Il valore limite di 5 ppm è stato scelto in quanto conforme al limite di rilevazione registrabile con metodi di routine, consentendo così di assicurare il massimo grado di rimozione di questi composti dagli estratti utilizzati a fini terapeutici (5).

Il GBE è raccomandato per il limite dei seguenti componenti: flavoni glicosidi; lattoni terpenici (ginkgolidi, bilobalide); solvente di estrazione: acetone 60%, da assumere per via orale in formulazioni farmaceutiche o come integratore alimentare. Preparati a base di GBE sono utilizzati per il trattamento sintomatico dei deficit cognitivi, di concentrazione, dei disturbi dell'umore nell'ambito di una strategia terapeutica globale nelle sindromi di demenza, per alterazioni vascolari ed altre indicazioni (6-8). I consumatori possono essere esposti al GBE anche attraverso prodotti contenenti Ginkgo, come tè, yogurt e cosmetici. Il Ginkgo biloba viene utilizzato in Europa anche come ingrediente in alimenti, come le cosiddette bevande "wellness".

La valutazione della sicurezza del GBE da parte della FDA

Le Autorità sanitarie come l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), *International Association of Resear-*

ch on Cancer (IARC), *European Medicines Agency* (EMA) hanno valutato che il GBE non rappresenta un rischio per l'uomo in rapporto a due fattori principali:

- dosi ammesse per l'uomo;
- caratteristiche dell'estratto (processo di estrazione controllato e contenuto di acidi ginkgolici < 5 ppm).

La statunitense *Food and Drug Administration* (FDA) ha invece denunciato una sospetta cancerogenicità del GBE sulla base di test condotti dal NTP.

Il GBE era stato testato dal NTP per la cancerogenicità in due studi di somministrazione orale in topi e ratti. Topi maschi e femmine erano stati trattati mediante *gavage* con uno specifico GBE di produzione cinese, contenente 31,2% di flavonolo, 15,4% di lattoni terpenici (bilobalide, 6,94%; ginkgolide A, 3,74%; ginkgolide B, 1,62%; ginkgolide C, 3,06%), acido ginkgolico ad una concentrazione di 10,45 ppm. Il trattamento aveva indotto un aumento significativo dell'incidenza di adenoma epatocellulare o carcinoma (combinato), carcinoma epatocellulare ed epatoblastoma. Il NTP concluse che negli animali da esperimento vi sono prove sufficienti per quanto riguarda la cancerogenicità del GBE. La valutazione globale del NTP e FDA è stata che il GBE può essere cancerogeno per l'uomo (4).

Le critiche alla metodologia

Dato il diffuso consumo di GBE i risultati hanno suscitato notevoli critiche da parte di ricercatori e organizzazioni come il *Committee for Herbal Medicinal Products* dell'EMA e l'*American Botanical Council* (5, 9, 10). Nello specifico sono state poste le seguenti critiche:

Dose: la dose massima utilizzata negli studi non era quella che ha causato il primo effetto tossico negli studi preliminari, come richiesto dalla metodologia accettata a livello internazionale, ma era stata molto più elevata, (massima dose somministrabile) causando agli animali uno stress metabolico in grado di indurre fenomeni specifici di oncogenesi.

Caratteristiche dell'estratto: La IARC (2), sottolinea che il materiale di prova era diverso da quelli ammessi dalla Farmacopea Europea e statunitense (USP). Infatti, nello studio dello NTP la concentrazione di acido ginkgolico era di 10,45 ppm, il doppio (2) del limite ammesso dalle autorità sanitarie internazionali. Si ricorda che l'acido ginkgolico è il componente la cui presenza è considerata un rischio nelle preparazioni contenenti GBE, per le sue peculiari caratteristiche tossicologiche (9, 11-13).

Inoltre, i risultati degli studi tossicologici dello NTP sul

GBE cinese non sono rilevanti e non appropriati per le altre formulazioni GBE. La stessa relazione finale del NTP sottolinea che i risultati rilevati nello studio riguardano solo il GBE cinese che non vi sono prove dirette che si riferiscono ad altri specifici GBE.

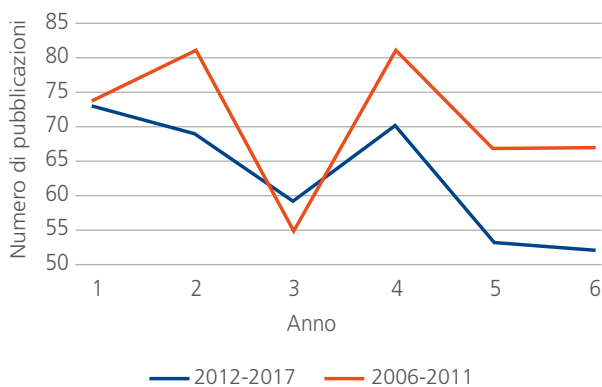
Impatto della valutazione del NTP

Nonostante le criticità descritte, la valutazione del NTP ha generato notevole preoccupazione e conseguentemente disincentivato le ricerche sul GBE. Il risultato è stato netto: dal 2012 della pubblicazione dei risultati degli studi condotti dal NTP, vi è stata una flessione molto evidente. Nella nostra ricerca abbiamo individuato 1651 pubblicazioni sul GBE censiti da PubMed dal 1950.

Tra il 2006 ed il 2011, prima della pubblicazione della valutazione del NTP sono stati pubblicati in media 70,83 lavori per anno, negli anni tra il 2012 ed il 2017 la media si è abbassata a 62,66 (-13%). Solo nel 2018 si è avuto un incremento con 100 lavori, peraltro da confermare nel 2019. Il dato è ancora più significativo se consideriamo negli stessi periodi le pubblicazioni su PubMed su "herbal medicines" sono passate da una media di 1812,83 a 2857,33 per anno, +57,62%. Nel 2018 le pubblicazioni sono state 3280. La Figura 1 mostra l'andamento per anno delle pubblicazioni sul GBE nei periodi 2006-2011 e 2012-2017.

L'impatto sugli studi è più controverso: la nostra ricerca su clinicaltrials.gov ha mostrato che attualmente gli studi in corso sul Ginkgo sono 85 nel mondo di cui 26 in Africa, 23 nel sud-Asia e solo 18 (21%) in Europa (Figura 2). Negli anni 2006-2011 sono registrati 21 studi, dei quali 8 (38%) in Europa. Si potrebbe pensare ad un ridotto interesse, tuttavia se consideriamo il Nord America (USA e Canada) nel 2006-2011 sono registrati 3 su 21 stu-

Pubblicazioni su GBE da PubMed



Lavori scientifici su GBE nei cinque anni precedenti (2006-11) e successivi (2012-17) alla pubblicazione dei risultati dello NTP (da PubMed)

Fig. 1

Studi in corso su GBE (da clinicaltrials.gov)

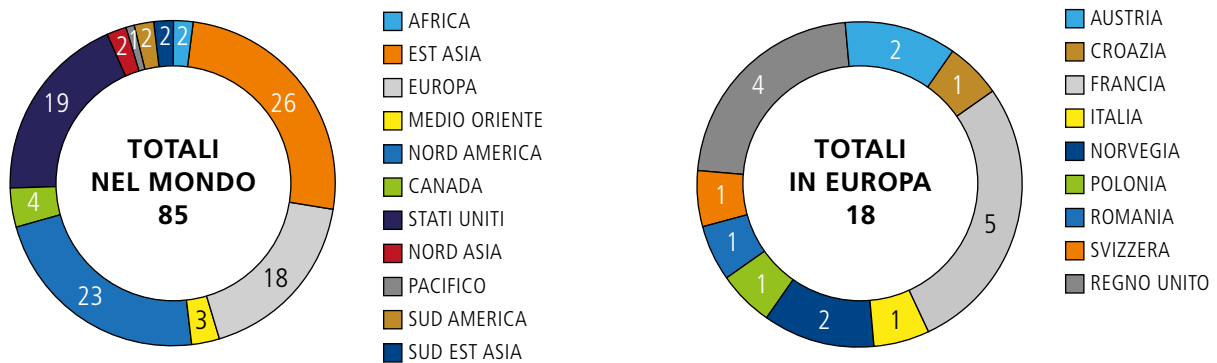


Fig. 2

di (14,2%) mentre oggi sono registrati 23 su 85 studi (27,05%). Dal momento che i ricercatori europei e nordamericani spesso condividono gli approcci e le linee di ricerca non possiamo trarre nessuna conclusione al proposito.

CONCLUSIONI

Il caso del GBE dimostra chiaramente che studi condotti in modo discutibile generano dati che hanno conseguenze imprevedibili da un punto di vista scientifico. In questo specifico caso, una valutazione condotta con metodiche discutibili da un ente governativo ha indotto una

riduzione delle pubblicazioni su una sostanza di grande interesse scientifico e con potenziali serie ricadute economiche e sanitarie. Riteniamo che sia necessaria un'armonizzazione delle metodiche, con una stretta attenzione alla provenienza e caratterizzazione degli estratti valutati, con dosaggi che riflettano l'effettivo uso umano. Riteniamo anche che la valutazione da parte di un'Autorità debba essere svolta da un gruppo di lavoro multidisciplinare, dove accanto al tossicologo ed al patologo, sia presente un esperto di farmacognosia e un clinico con esperienza di preparati di origine vegetale.

BIBLIOGRAFIA

1. Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwel N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA, Schoenberger NE. Ginkgo biloba Extract: Mechanisms and Clinical Indications. *Arch Phys Med Rehabil.* 2000;81(5):668-78. doi:10.1016/S0003-9993(00)90052-2.
2. Ginkgo Biloba in International Agency for Research on Cancer, WHO. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 108. WHO Press, 2016; 108:73-89. Disponibile all'indirizzo: <https://publications.iarc.fr/132>
3. European Medicines Agency. European Union herbal monograph on Ginkgo biloba L., folium. 2015;44. Disponibile all'indirizzo: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-ginkgo-biloba-l-folium_en.pdf
4. National Toxicology Program (NTP) technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ginkgo biloba extract (cas no. 90045-36-6) in f344/n rats and b6c3f1/n mice. 2013; NTP TR 578; NIH Publication No. 13-5920.
5. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment report on Ginkgo biloba L., folium. Eur Med Agency. 2014; 44:1-7. Disponibile all'indirizzo: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-ginkgo-biloba-l-folium_en.pdf
6. Yang G, Wang Y, Sun J, Zhang K, Liu J. Ginkgo Biloba for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials *Curr Top Med Chem.* 2016;16(5):520-8 doi: 10.2174/156802661566150813143520
7. Tian J, Liu Y, Chen K. Ginkgo biloba Extract in Vascular Protection: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Curr Vasc Pharmacol.* 2017;15(6):532-548. doi: 10.2174/1570161115666170713095545.
8. Kang JM, L in S. Ginkgo biloba and its potential role in glaucoma *Curr Opin Ophthalmol.* 2018 Mar;29(2):116-120. doi: 10.1097/ICU.0000000000000459
9. Heinonen T, Gaus W. Cross matching observations on toxicological and clinical data for the assessment of tolerability and safety of Ginkgo biloba leaf extract. *Toxicology.* 2015; 327:95-115. doi: 10.1016/j.tox.2014.10.013.
10. American Botanical Council. Herbal Medicine, Expanded Commission E Monograph (internet) Ginkgo biloba leaf extract, consultato il 3/9/2019. Disponibile all'indirizzo: <http://cms.herbalgram.org/expandedE/GinkgoBilobaleafextract.html?ts=1567856840&signature=8f3fa1b41b801b1dbfd9d5e182637dc7>
11. Yao QQ, Li L, Xu MC, Hu HH, Zhou H, Yu LS, Zeng S. Mechanism for ginkgolic acid (15 : 1) -induced MDCK cell necrosis : Mitochondria and lysosomes damages and cell cycle arrest. *Chin J Nat Med.* 2017;15(5):375-83. doi: 10.1016/S1875-5364(17)30058-4.
12. Qian Y, Peng Y, Shang E, Zhao M, Yan L, Zhu Z. Chemico-Biological Interactions Metabolic profiling of the hepatotoxicity and nephrotoxicity of Ginkgolic acids in rats using ultra-performance liquid chromatography-high-definition mass spectrometry. *Chem Biol Interact.* 2017;273:11-7. doi: 10.1016/j.cbi.2017.05.020.
13. Yao QQ, Li L, Xu MC, Hu HH, Zhou H, Yu LS, Zeng S. The metabolism and hepatotoxicity of ginkgolic acid (17 : 1) in vitro. *Chin J Nat Med.* 2018;16(11):829-837. doi: 10.1016/S1875-5364(18)30124-9.

Erbe e funghi medicinali per il calo ponderale: una panoramica

Medicinal herbs and mushrooms for weight loss: an overview

Michele Antonelli¹, Davide Donelli²

¹ Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma (Parma), Terme di Monticelli (Parma), Servizio di Consulenza in Medicina Integrativa e Complementare (Reggio Emilia)

² Terme di Monticelli (Parma), Servizio di Consulenza in Medicina Integrativa e Complementare (Reggio Emilia)

Abstract

Background. *Overweight and obesity are conditions characterized by a growing epidemiological trend.*

Objective. *The present review aims to collect evidence on the efficacy and safety of remedies derived from medicinal herbs and mushrooms commonly used for weight loss.*

Results. *Various remedies, grouped on the basis of their mechanism of action, have been analyzed and discussed.*

Conclusions. *Overall, the most interesting integrative remedies which favor weight loss in overweight or obese subjects seem to be *Garcinia cambodia*, *Camellia sinensis*, green coffee, *Amorphophallus konjac*, chitosan, and *Phaseolus vulgaris*, acting through different mechanisms on metabolism, nutrient absorption and the sensation of hunger. Further studies are needed to better evaluate the efficacy and safety profile of weight-loss supplements.*

Key words: *Review; Medicinal plants; Nutraceuticals; Supplements; Obesity; Weight loss.*

Riassunto

Introduzione. Il sovrappeso e l'obesità sono condizioni caratterizzate da una tendenza epidemiologica in crescita.

Obiettivo. La presente revisione ha l'obiettivo di raccogliere le evidenze sull'efficacia e sulla sicurezza dei rimedi fitoterapici o micoterapici comunemente impiegati per il calo ponderale.

Risultati. Vari rimedi, raggruppati per meccanismo d'azione, sono stati analizzati e discussi.

Conclusioni. Complessivamente, i rimedi integrativi più interessanti per favorire il calo ponderale in soggetti sovrappeso od obesi sembrano essere la *Garcinia cambodia*, la *Camellia sinensis*, il caffè verde, l'*Amorphophallus konjac*, il chitosano, ed il *Phaseolus vulgaris*, i quali agiscono attraverso vari meccanismi sul metabolismo, sull'assorbimento dei nutrienti e sulla sensazione di fame. Ulteriori studi sono necessari per poter valutare con maggiore approfondimento il profilo di efficacia e sicurezza degli integratori ad azione dimagrante.

Parole chiave: Revisione; Piante medicinali; Nutraceutici; Integratori; Obesità; Calo ponderale.

Introduzione Il sovrappeso (BMI \geq 25) e l'obesità (BMI \geq 30) sono condizioni caratterizzate da un anormale o eccessivo accumulo di adipe (1). In base ai dati epidemiologici dell'OMS, si stima che l'obesità sia triplicata dal 1975 ad oggi, con una prevalenza mondiale nel 2016 di circa 1,9 miliardi di soggetti in sovrappeso ed oltre 650 milioni affetti da obesità (1). L'eccesso ponderale è un rischio noto per patologie cardiovascolari, condizioni dismetaboliche, malattie muscoloscheletriche, ed alcune forme neoplastiche (1), e la sua correzione è spesso difficoltosa a causa della scarsa compliance dei pazienti ai programmi standard di riduzione del peso (2). Perciò, diversi trattamenti integrativi sono stati esplorati per mi-

gliorare il controllo ponderale (3) e quello lipidico (4). La presente revisione ha l'obiettivo di raccogliere le evidenze sull'efficacia e la sicurezza dei più comuni rimedi fitoterapici o micoterapici ad azione dimagrante.

Materiali e metodi. Una revisione narrativa della letteratura scientifica è stata condotta, ricorrendo ad una ricerca su Medline, Cochrane Library, e Google Scholar, con particolare attenzione agli articoli che descrivevano il profilo di efficacia per il calo ponderale e di sicurezza clinica delle piante e funghi medicinali, nonché dei loro estratti e derivati. Priorità è stata data alle revisioni sistematiche e meta-analisi sull'argomento, così come ai singoli trials quando una sintesi della letteratura scientifica non era disponibile.

Risultati. I principali risultati della ricerca sono riassunti nella Tabella 1.

Rimedi integrativi con un'azione diretta sul metabolismo: **Garcinia cambodia.** La Garcinia cambodia è una pianta asiatica la cui scorza è ricca di acido idrossicitrico, un composto con attività ipolipemizzante ed anoressizzante (3). Tale sostanza potrebbe agire come un inibitore

dell'enzima ATP-citrato-liasi, incrementando la sintesi del glicogeno a livello epatico, riducendo la lipogenesi e la sensazione di fame (3,5). Dati provenienti da nove trials inclusi in una meta-analisi hanno dimostrato un effetto a vantaggio dell'intervento rispetto al placebo, seppur caratterizzato da una significatività borderline (MD=-0,88 kg a circa 8-12 settimane; p=0,05) (5). Globalmente, nei trials clinici non sono state riportate differenze tra l'estratto di Garcinia ed il placebo in termini di eventi avversi, a parte disturbi gastroenterici (5). Tuttavia, a causa della breve durata degli studi disponibili e della segnalazione di diversi casi di tossicità epatica acuta a seguito dell'assunzione di integratori contenenti Garcinia (6), il profilo di sicurezza di questa pianta e le sue interazioni con altri farmaci restano ancora da valutare con cautela.

Gymnema sylvestre. La *Gymnema sylvestre* è una pianta utilizzata nella medicina ayurvedica per le sue proprietà anti-diabetiche, dato che gli acidi gymnemici di cui è ricca sono in grado di ridurre l'assorbimento intestinale del glucosio attraverso vari meccanismi e di stimolare la produzione di insulina (7,8). La maggior parte delle evidenze a sostegno dell'uso della gymnema per il calo ponderale provengono da studi preclinici (7,8), mentre in un trial clinico la sua efficacia è stata testata in combinazio-

RISULTATI DELLA REVISIONE SU EFFICACIA E SICUREZZA DEI RIMEDI INTEGRATIVI FITOTERAPICI O MICOTERAPICI PIÙ COMUNEMENTE IMPIEGATE A SCOPO DIMAGRANTE

Meccanismo d'azione	Esempi	Efficacia	Sicurezza
Azione diretta sul metabolismo	Garcinia, gymnema	Variabile in base al meccanismo d'azione	Incertezza dovuta alle scarsità di informazioni
Rimedi ricchi di xantine (antagonismo dell'adenosina)	Tè verde, caffè verde, guaranà	Variabile	Variabile, peggiore per le piante ad alto contenuto di caffeina
Azione di tipo adrenergico	Efedra, arancio amaro, chetone del lampone	Variabile o incerta	Pessima (sconsigliate)
Riduzione dell'assorbimento intestinale	Fibre vegetali, chitosano, fagiolo bianco	Di solito modesta	In generale piuttosto buona
Azione mediata dal microbiota intestinale	Reishi	Dati ad oggi insufficienti	Incerta
Azione diuretica o lassativa	Pilosella, ciliegio, orthosiphon, lassativi antrachinonici	Inutili per l'eccesso ponderale	Pessima se impiegate impropriamente e per lunghi periodi

Tab. 1

ne con altre sostanze come l'acido idrossicitrico (9), per cui risulta difficile quantificare l'esatto contributo della gymnema al risultato osservato. In base ai dati disponibili, la gymnema appare abbastanza sicura e gli effetti collaterali più frequentemente segnalati sono l'ipoglicemia e l'alterazione del gusto (8).

Rimedi integrativi ricchi di xantine (antagonismo dell'adenosina):

Camellia sinensis. Le foglie di *Camellia sinensis* sono tradizionalmente impiegate per la produzione del tè verde, ed il loro estratto, ricco di xantine e polifenoli, ha effetti lipolitici ed antiossidanti (3). In una meta-analisi, le catechine hanno dimostrato di possedere un effetto modesto ma positivo sul calo ponderale e sul suo mantenimento a seguito della perdita di peso (MD=-1,31 kg a 12-13 settimane; $p<0,001$) (10). In generale, il tè verde, se consumato con moderazione, è considerato un prodotto sicuro, ampiamente utilizzato nella dieta orientale (11). I dati disponibili sulla sicurezza degli estratti di tè verde indicano anche per essi un buon profilo di tollerabilità, soprattutto se assunti a stomaco pieno (12).

Caffè verde. Gli estratti di caffè verde (*Coffea canephora robusta*) sono spesso utilizzati per il calo ponderale in virtù del loro contenuto di caffeina (effetto stimolante e termogenico) e di acido clorogenico, in grado di agire a livello metabolico (13,14). I risultati di una meta-analisi di tre studi clinici suggeriscono un effetto significativo sul calo ponderale (MD=-2,47 kg a 4-12 settimane; $p<0,01$) (13). Gli effetti avversi del caffè verde sono per lo più correlabili alla caffeina in esso contenuta (aritmie, agitazione psico-motoria, turbe gastroenteriche).

Paullinia cupana. La *Paullinia cupana*, comunemente nota come "guaranà", è una pianta ricca di caffeina (4 volte più del caffè) originaria del Brasile, con un'azione di inibizione dell'adipogenesi che potrebbe interessare anche meccanismi di tipo epigenetico (15,16). I dati clinici sull'efficacia della *Paullinia cupana* nel favorire il calo ponderale sono incerti, dal momento che la sua azione è stata testata assieme ad altre sostanze dimagranti, rendendo difficile stimare l'entità dell'effetto attribuibile al solo guaranà (17,18). L'elevato tasso di caffeina limita la sicurezza clinica degli estratti di questa pianta (19).

Rimedi integrativi con un'azione di tipo adrenergico:

Efedra sinica. L'*Efedra sinica* è una pianta di origini asiatiche il cui estratto contiene efedrina, un alcaloide con proprietà adrenergiche e stimolanti (20). Le prove di ef-

ficacia dell'efedra nel favorire il calo ponderale riportate da una meta-analisi suggeriscono un possibile effetto a breve termine (<6 mesi) di -0,9 kg/mese rispetto al placebo (20). L'efedrina, però, in virtù delle sue proprietà farmacologiche, risulta scarsamente maneggevole e può causare effetti collaterali anche gravi come aritmie cardiache, alterazioni del sistema nervoso autonomo, turbe psichiatriche e gastrointestinali (20).

Citrus aurantium. L'arancio amaro (*Citrus aurantium*) è un agrume originario dell'Asia tropicale la cui scorza è ricca di sinefrina, un alcaloide simile all'efedrina dalle supposte proprietà dimagranti (21). L'efficacia per il calo ponderale degli estratti di *Citrus aurantium* titolati in sinefrina è stata classificata come "incerta" da diversi autori, a fronte di un profilo di sicurezza sconsigliato, sia per gli effetti avversi (pericolosi in individui cardio-vascolari o ipertiroidei), sia per le interazioni con vari farmaci (in virtù delle proprietà adrenergiche della sinefrina e della possibile inibizione di varie isoforme di CYP-450) (3,21,22).

Chetone del lampone. Il cosiddetto "chetone del lampone" corrisponde al 4-(4-idrossifenil)-2-butanone, un composto aromatico estratto dal lampone rosso (*Rubus idaeus*) (23). Le prove a sostegno dell'attività di questa sostanza come agente lipolitico provengono soprattutto da studi preclinici su cavia, che suggeriscono un suo possibile ruolo nella promozione della lipolisi norepinefrino-indotta e nell'ossidazione degli acidi grassi (23,24). I dati sulla sicurezza del "chetone del lampone" sono quasi del tutto assenti, con potenziali effetti avversi (cardiotossicità, alterazioni dello sviluppo e della riproduzione) indicati da modelli predittivi basati sui dati di studi di laboratorio (25).

Rimedi integrativi che riducono l'assorbimento intestinale dei nutrienti:

Rimedi fitoterapici ricchi di fibre. Una delle fibre vegetali più interessanti da un punto di vista clinico è il glucomannano, estratto dall'*Amorphophallus konjac*; altre fibre utilizzate sono lo psillio (derivato dalla *Plantago ovata*), la gomma di Guar (il cui costituente principale è il galattomannano), e l'alginato (estratto dalle alghe o dall'*Althaea officinalis*) (3). Le fibre agiscono aumentando la massa del contenuto enterico senza apportare calorie e riducono l'assorbimento dei nutrienti, tra cui glucidi e lipidi (3). I risultati di tre meta-analisi sull'efficacia clinica del glucomannano sembrano complessivamente suggerire un possibile effetto sul calo ponderale (MD=-0,22 kg

a 3-12 settimane; $p > 0,05$ (26); $MD = -0,79$ kg; $p < 0,05$ a 4-16 settimane (27); $MD = -3,17$ kg a 8 settimane; $p < 0,05$ (28)) ed un'azione significativa di tipo ipolipemizzante (26-28). Risultati meno incoraggianti sono stati riscontrati per altre fibre vegetali come la gomma di Guar o lo psillio (29,30). Gli effetti avversi della somministrazione di fibre sono di solito attribuibili alla loro azione sul tratto gastroenterico; attenzione comunque deve essere posta alla co-somministrazione di altre sostanze il cui assorbimento può essere ridotto dalle fibre (3,26).

Chitosano. Il chitosano è un derivato della chitina che può essere estratto dall'esoscheletro dei crostacei marini o dai funghi (31). Esso viene utilizzato per ridurre i livelli circolanti di colesterolo e per favorire il calo ponderale, e pare agire a livello gastroenterico, dove interagisce chimicamente con gli acidi grassi, favorendone l'eliminazione piuttosto che l'assorbimento (31). Una revisione Cochrane

di 15 trials ha confermato l'efficacia del chitosano rispetto al placebo sul calo ponderale ($MD = -1,7$ kg ad almeno 4 settimane; $p < 0,00001$) (32). Mancano purtroppo dati a lungo termine e gli studi inclusi sono caratterizzati da una bassa qualità (32). Quanto alla sicurezza, è importante conoscere l'origine del chitosano (crostacei o funghi) per evitare eventuali reazioni allergiche.

Phaseolus vulgaris. Dal fagiolo bianco (*Phaseolus vulgaris*) viene ottenuto un estratto acquoso standardizzato in unità inibenti le alfa-amilasi, il quale, in dieci studi clinici (tre dei quali "placebo-controlled") ha dimostrato proprietà interessanti e significative sul dimagrimento di soggetti sovrappeso od obesi a 8-12 settimane, ed anche un miglioramento del picco glicemico post-prandiale e della trigliceridemia (33). Il profilo di sicurezza delineato nei suddetti studi clinici è apparso buono, con effetti avversi modesti come turbe gastroenteriche temporanee (33).

Rimedi fitoterapici o micoterapici per i quali esistono evidenze di efficacia sul calo ponderale



Riconoscimenti

Si ringrazia Lorenzo Boschi per il supporto grafico nella realizzazione della Figura.

Fig. 1

Rimedi integrativi con una possibile azione sul microbioma intestinale:

Funghi medicinali. Vari funghi, incluso il *Ganoderma lucidum* (Reishi) e la *Grifola frondosa* (Maitake), sono stati proposti per il trattamento dell'obesità e delle sue complicanze metaboliche, sebbene la maggior parte delle evidenze ad oggi disponibili provenga solo da studi su modelli murini (34-37).

In particolare, per il *Ganoderma lucidum* è stato ipotizzato un meccanismo d'azione sul controllo ponderale mediato dalla modulazione della flora microbica intestinale (36,38,39). I dati sulla sicurezza dei funghi medicinali restano da definire con precisione e, in via cautelativa, se ne sconsiglia l'utilizzo da parte di pazienti epatopatici o affetti da disturbi autoimmuni (40).

Rimedi integrativi con un'azione diuretica o lassativa:

Vari rimedi fitoterapici. Sebbene spesso utilizzate per il calo ponderale, le piante medicinali con un'azione diuretica (*Pilosella Vall.*, *Cerasus avium*, *Orthosiphon stamineus*, etc.) o lassativa (lassativi antrachinonici) non agiscono sull'eccesso di grasso (3). Il cattivo utilizzo di tali rimedi

per il calo ponderale può determinare effetti avversi anche gravi ed interazioni pericolose con altri farmaci e sostanze assunte.

Discussione. La somministrazione ragionata di alcuni rimedi integrativi ad azione dimagrante può essere un'utile terapia complementare per l'eccesso ponderale, purché si svolga sotto la supervisione medica. In particolare, sulla base dei dati raccolti nella presente revisione, i rimedi più interessanti sembrano essere la *Garcinia cambodia*, la *Camellia sinensis*, il caffè verde,

l'*Amorphophallus konjac*, il chitosano, ed il *Phaseolus vulgaris*, in grado di agire attraverso vari meccanismi che vanno dalla riduzione dell'assorbimento intestinale di nutrienti ad un'azione diretta sul metabolismo energetico e sulla sensazione di fame (Figura 1).

Data la scarsità di dati sugli effetti di molti integratori dimagranti, il loro uso è comunque sconsigliato in soggetti in età pediatrica o avanzata, nonché in gravidanza ed allattamento. Ulteriori studi sono necessari per poter valutare con maggiore approfondimento le interazioni dei rimedi analizzati con farmaci ed alimenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Obesity and overweight. (<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>). (Accessed September 22, 2019)
2. Hadziabdi MO, Mucalo I, Hrabá P, et al. Factors predictive of drop-out and weight loss success in weight management of obese patients. *J. Hum. Nutr. Diet.* 2015;28 Suppl 2:24–32. (<http://dx.doi.org/10.1111/jhn.12270>)
3. Firenzuoli F. Fitoterapia: Guida all'uso clinico delle piante medicinali. 2015; p.379-412.
4. Cicero AFG, Colletti A, Bajraktari G, et al. Lipid lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel. *Arch. Med. Sci.* 2017;13(5):965–1005. (<http://dx.doi.org/10.5114/aoms.2017.69326>)
5. Onakpoya I, Hung SK, Perry R, et al. The Use of Garcinia Extract (Hydroxycitric Acid) as a Weight loss Supplement: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Clinical Trials. *J. Obes.* 2011;2011:509038. (<http://dx.doi.org/10.1155/2011/509038>)
6. Crescioli G, Lombardi N, Bettiol A, et al. Acute liver injury following Garcinia cambogia weight-loss supplementation: case series and literature review. *Intern. Emerg. Med.* 2018;13(6):857–872. (<http://dx.doi.org/10.1007/s11739-018-1880-4>)
7. Pothuraju R, Sharma RK, Chagalamarri J, et al. A systematic review of *Gymnema sylvestris* in obesity and diabetes management. *J. Sci. Food Agric.* 2014;94(5):834–840. (<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6458>)
8. Ulbricht C, Abrams TR, Basch E, et al. An evidence-based systematic review of *Gymnema sylvestris* (*Gymnema sylvestris* R. Br.) by the Natural Standard Research Collaboration. *J. Diet. Suppl.* 2011;8(3):311–330. (<http://dx.doi.org/10.3109/19390211.2011.597977>)
9. Preuss HG, Garis RI, Bramble JD, et al. Efficacy of a novel calcium/potassium salt of (-)-hydroxycitric acid in weight control. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 2005;25(3):133–144. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16366421>)
10. Hursel R, Viechtbauer W, Westerterp-Plantenga MS. The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. *Int. J. Obes.* 2009;33(9):956–961. (<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2009.135>)
11. Boehm K, Borrelli F, Ernst E, et al. Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2009;(3):CD005004. (<http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD005004.pub2>)
12. Sarma DN, Barrett ML, Chavez ML, et al. Safety of green tea extracts : a systematic review by the US Pharmacopeia. *Drug Saf.* 2008;31(6):469–484. (<http://dx.doi.org/10.2165/00002018-200831060-00003>)
13. Onakpoya I, Terry R, Ernst E. The use of green coffee extract as a weight loss supplement: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2011;2011. (<http://dx.doi.org/10.1155/2011/382852>)
14. Meng S, Cao J, Feng Q, et al. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2013;2013:801457. (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/801457>)
15. Lima N da S, Numata E de P, Mesquita LM de S, et al. Modulatory Effects of Guarana (*Paullinia cupana*) on Adipogenesis. *Nutrients.* 2017;9(6). (<http://dx.doi.org/10.3390/nu9060635>)
16. Moustakas D, Mezzio M, Rodriguez BR, et al. Guarana provides additional stimulation over caffeine alone in the planarian model. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123310. (<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123310>)
17. Andersen T, Fogh J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *J. Hum. Nutr. Diet.* 2001;14(3):243–250. (<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-277X.2001.00290.x>)
18. Boozer CN, Nasser JA, Heymsfield SB, et al. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001;25(3):316–324. (<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijo.0801539>)
19. Onakpoya I, Ernst E. Safety of guarana-containing weight loss supplements: a mini-review. 2012;1(1):45–50. (<http://dx.doi.org/>). (Accessed October 1, 2019)
20. Shekelle PG, Hardy ML, Morton SC, et al. Efficacy and Safety of Ephedra and Ephedrine for Weight Loss and Athletic Performance: A Meta-analysis. *JAMA.* 2003;289(12):1537. (<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.289.12.1470>)
21. Ulbricht C, Costa D, Giese N, et al. An evidence-based systematic review of bitter orange (*Citrus aurantium*) by the Natural Standard Research Collaboration. *J. Diet. Suppl.* 2013;10(4):391–431. (<http://dx.doi.org/10.3109/19390211.2013.830821>)

22. Bent S, Padula A, Neuhaus J. Safety and efficacy of citrus aurantium for weight loss. *Am. J. Cardiol.* 2004;94(10):1359–1361. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.07.137>)
23. Morimoto C, Satoh Y, Hara M, et al. Anti-obese action of raspberry ketone. *Life Sci.* 2005;77(2):194–204. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.029>)
24. Park KS. Raspberry ketone increases both lipolysis and fatty acid oxidation in 3T3-L1 adipocytes. *Planta Med.* 2010;76(15):1654–1658. (<http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1249860>)
25. Bredsdorff L, Wedeby EB, Nikolov NG, et al. Raspberry ketone in food supplements--High intake, few toxicity data--A cause for safety concern? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2015;73(1):196–200. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.022>)
26. Onakpoya I, Posadzki P, Ernst E. The efficacy of glucomannan supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J. Am. Coll. Nutr.* 2014;33(1):70–78. (<http://dx.doi.org/10.1080/07315724.2014.870013>)
27. Sood N, Baker WL, Coleman CI. Effect of glucomannan on plasma lipid and glucose concentrations, body weight, and blood pressure: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008;88(4):1167–1175. (<http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/88.4.1167>)
28. Zalewski BM, Chmielewska A, Szajewska H. The effect of glucomannan on body weight in overweight or obese children and adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition.* 2015;31(3):437–42.e2. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2014.09.004>)
29. Pittler MH, Ernst E. Guar gum for body weight reduction: meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Med.* 2001;110(9):724–730. (<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934301007021>)
30. Darooghegi Mofrad M, Mozaffari H, Mousavi SM, et al. The effects of psyllium supplementation on body weight, body mass index and waist circumference in adults: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019;1–14. (<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2018.1553140>)
31. Shields KM, Smock N, McQueen CE, et al. Chitosan for weight loss and cholesterol management. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 2003;60(13):1310–2, 1315–6. (<http://dx.doi.org/10.1093/ajhp/60.13.1310>)
32. Jull AB, Ni Mhurchu C, Bennett DA, et al. Chitosan for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2008;(3):CD003892. (<http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD003892.pub3>)
33. Barrett ML, Udani JK. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr. J.* 2011;10:24. (<http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-10-24>)
34. Amin R, Islam MZ, Sen M, et al. Anti-Obesity Effect Of Mushroom (*Ganoderma Lucidum*) On Experimentally Induced Obese Rats. *Anwer Khan Mod Med Coll J.* 2012;3(2):11–14. (<https://www.banglajol.info/index.php/AKMMCI/article/view/11687>)
35. Aoki H, Hanayama M, Mori K, et al. Grifola frondosa (Maitake) extract activates PPAR and improves glucose intolerance in high-fat diet-induced obese mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2018;82(9):1550–1559. (<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2018.1480348>)
36. Chang C-J, Lin C-S, Lu C-C, et al. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nat. Commun.* 2015;6:7489. (<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8489>)
37. Ganesan K, Xu B. Anti-Obesity Effects of Medicinal and Edible Mushrooms. *Molecules* 2018;23(11). (<http://dx.doi.org/10.3390/molecules23112880>)
38. Jayachandran M, Xiao J, Xu B. A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(9). (<http://dx.doi.org/10.3390/ijms18091934>)
39. Delzenne NM, Bindels LB. Gut microbiota: *Ganoderma lucidum*, a new prebiotic agent to treat obesity? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015;12(10):553–554. (<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2015.137>)
40. Firenzuoli F. Interazioni tra erbe, alimenti e farmaci. *Tecniche Nuove*; 2001; p.174-176.

Nessuna fonte di finanziamento è stata ricevuta per la conduzione del presente studio. Nessun conflitto di interesse deve essere dichiarato dagli autori.

Valutazione dell'effetto della supplementazione dietetica con un integratore combinato a base di frazione polifenolica del bergamotto ed estratto standardizzato di carciofo sulla modulazione dei livelli di colesterolemia LDL in soggetti affetti da ipercolesterolemia poligenica

Evaluation of the effect of dietary supplementation with a combined nutraceutical based on polyphenolic fraction of bergamot and standardized artichoke extract on the modulation of LDL cholesterolemia in subjects affected by polygenic hypercholesterolemia

Arrigo F.G. Cicero, Federica Fogacci, Martina Mezzadri, Maddalena Veronesi, Elisa Grandi, Claudio Borghi

Ambulatorio dislipidemie e aterosclerosi, AOU Policlinico S. Orsola-Malpighi, Alma Mater Studiorum Università di Bologna

Abstract

This preliminary open clinical study conducted on 30 patients (M:F=1:1) with sub-optimal LDL cholesterol values, wants to evaluate the efficacy of the combined nutraceutical supplement (Eufortyn Colesterolo Plus®) of phytosomal polyphenolic fraction extracted from bergamot (Vazguard®) and standardized extract of artichoke (Pycrinil®), associated with highly bioavailable Coenzyme Q10 and zinc, in the reduction of plasma LDL levels. The product was highly tolerable with a 100% compliance to the treatment. After 56 days of administration of 1 tablet/day, we registered a significant reduction of LDL cholesterol (-18.5%), TGC (-15.6%) e non-HDL cholesterol (-12.7%) values; we have also notice a reduction of the values of GOT (-20%), GPT (-21.7%),

and gGT (-11%). Fasting plasma glucose decreased, as well, although in smaller amount (-3.8%). Despite the small sample of patients and the short treatment period, the results obtained confirm the lowering action of the combined extract of bergamot and artichoke on cholesterolemia and triglyceridemia: in fact, most of treated patients, 67%, reported a reduction of LDL cholesterolemia > 15%. Furthermore, the mild hypoglycemic action and the reduction of GOT, GPT, and gGT values suggest an improvement of the insulin-sensitivity in the enrolled subjects.

Key words: Cholesterolemia, Efficacy, Artichoke Extract, Bergamot Extract Phytosome, Fasting plasma glucose, Safety, Vazguard®, Pycrinil®.

Abstract

Questo studio clinico preliminare condotto in aperto su 30 soggetti (M:F= 1:1) con valori sub-ottimali di colesterolo LDL, intendeva valutare l'efficacia dell'integratore nutraceutico combinato (Eufortyn Colesterolo Plus®) costituito da frazione polifenolica estratta da bergamotto e fitosomizzata (Vazguard®) ed estratto standardizzato di carciofo (Pycrinil®), associati a coenzima Q10 ad alta biodisponibilità e zinco, nella riduzione dei livelli ematici di colesterolemia LDL. Dopo 56 giorni di somministrazione di una compressa/die, il prodotto è risultato estremamente tollerato, con una compliance pari al 100%. Abbiamo quindi registrato un notevole calo dei valori plasmatici di colesterolo LDL (-18,5%), TG (-15,6%) e colesterolo non HDL (-12,7%), oltre ad una riduzione dei valori di GOT (-20%), GPT (-21,7%), e GT (-11%). Interessante notare come anche i valori di glicemia siano calati, se pur in quantità più modeste (-3,8%). Nonostante il piccolo campione di soggetti in studio e la breve durata del trattamento, i risultati ottenuti hanno confermato l'azione ipocolesterolemizzante e ipotrigliceridizzante degli estratti combinati di bergamotto e carciofo (la maggioranza dei pazienti trattati, il 67%, ha infatti riportato una riduzione della colesterolemia LDL >15%). Inoltre, la blanda azione ipoglicemizzante e la riduzione dei valori di GOT, GPT e GT supportano l'idea che questo nutraceutico possa avere un'influenza positiva sull'insulino-sensibilità.

Parole chiave: Colesterolemia, Efficacia, Estratto di Bergamotto fitosomale, Estratto di carciofo, Glicemia, Sicurezza, Vazguard®, Pycrinil®.

Introduzione

La colesterolemia LDL è linearmente associata al rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, e gli studi di genetica di popolazione mostrano come anche livelli appena sub-ottimali di colesterolemia LDL, quando presenti costituzionalmente fin da giovane età, rappresentano un fattore di rischio (1). Le nuove linee guida delle società europee di cardiologia (ESC) e dell'aterosclerosi (EAS) enfatizzano come è importante mantenere bassi valori di LDL-C². I livelli di LDL debbono essere ridotti il più possibile per prevenire le malattie cardiovascolari, in particolare nei pazienti a rischio elevato e molto elevato. Si raccomanda che i pazienti a rischio molto elevato (in prevenzione primaria e secondaria) raggiungano un livello di LDL-C < 55 mg/dl o < 1,4 mmol/l ed almeno il 50% di riduzione rispetto al

basale dei livelli di LDL-C. Nei pazienti a rischio elevato, il livello desiderato di LDL-C è < 70 mg/dl o < 1,8 mmol/l ed almeno il 50% di riduzione rispetto al basale dei livelli di LDL-C. Questi obiettivi rinforzano il concetto che minori sono i livelli di LDL-C, migliore è la prevenzione degli eventi CV nei pazienti a rischio molto elevato (2).

Ne deriva l'importanza della riduzione della lipidemia per ridurre i rischi cardiovascolari (3). Molti studi clinici e meta-analisi mostrano che esiste una relazione tra una riduzione dei livelli di LDL-C ed una riduzione del rischio di CVD (2). In particolare, una meta-analisi del Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, su dati derivati da 14 studi randomizzati controllati, che ha coinvolto 90.056 soggetti, ha dimostrato una importante riduzione degli eventi coronarici e vascolari, correlata ad una importante riduzione nei livelli assoluti di LDL-C (4).

Inoltre, in un ulteriore report CTT Collaboration su più di 170.000 soggetti, si vede come in corso di trattamento per la riduzione della colesterolemia, per ogni ulteriore riduzione di LDL-C di 1 mmol/l (~40 mg/dl) si ha una riduzione di circa un quinto del rischio di malattia coronarica e stroke (5). Una mmol/l è una riduzione raggiungibile grazie ad un miglioramento nello stile di vita associato all'assunzione di prodotti dietetici che riducono i livelli di colesterolemia LDL (6). Lo sviluppo di integratori dietetici in grado di modulare anche di poche decine di milligrammi/decilitro i livelli di colesterolemia LDL potrebbe avere un impatto preventivo importante nella popolazione (6).

Numerose evidenze scientifiche precliniche e cliniche supportano la sinergia di interventi finalizzati a ridurre farmacologicamente la colesterolemia LDL via inibizione dell'assorbimento intestinale del colesterolo (es.: con ezetimibe o resine a scambio ionico) (7), inibizione della sintesi epatica del colesterolo (es: con statine) (8), ed eventualmente induzione del metabolismo epatico del colesterolo via inibizione di PCSK9 (9). Alcuni composti di origine naturale riducono efficacemente la colesterolemia con meccanismi d'azione farmaco-simili (es.: riso rosso fermentato, berberina), ma la loro modalità di produzione prevede procedimenti che li allontanano dal prodotto originale (es.: la monacolina K è strutturalmente identica alla lovastatina, la berberina commerciale è purificata al 99%, essendo quindi a tutti gli effetti un farmaco) (10).

In questo contesto le alternative potrebbero essere gli estratti di bergamotto standardizzati in frazione polifenolica e gli estratti di carciofo. I primi hanno ad oggi dato risposte cliniche molto variabili per la difficoltà di standardizzazione del prodotto, i secondi ottime risposte ma per

dosi usualmente elevate difficilmente compatibili con l'impiego come integratori (11).

L'obiettivo di questo studio preliminare è stato quindi quello di valutare l'effetto della supplementazione dietetica di un integratore combinato contenente frazione polifenolica fitosomale del bergamotto (Vazguard®) associato ad estratto standardizzato di carciofo (Pycrinil®), associati a coenzima Q10 ad alta biodisponibilità e zinco, sull'assetto glicometabolico di soggetti con livelli subottimali di colesterolemia LDL.

Metodi

Lo studio pilota si propone in aperto con confronto dei parametri studiati vs. i valori registrati alla baseline.

Abbiamo quindi arruolato consecutivamente 30 soggetti di entrambi i sessi (M:F= 1:1) secondo i seguenti criteri di inclusione:

- Età 30-75 anni
 - LDL-C= 115-160 mg/dl
 - TG<400 mg/dl
 - Eventuali terapie preventive stabilizzate per tipo e dose da almeno 3 mesi
 - Ottenimento del consenso informato
- Sono stati quindi applicati i seguenti criteri di esclusione:
- Intolleranza nota agli integratori testati
 - Pazienti in prevenzione secondaria per malattie cardiovascolari o ad alto rischio di sviluppare malattie cardiovascolari
 - Diabete mellito scompensato
 - Insufficienza renale o epatica cronica
 - Obesità (Indice di Massa Corporea >30 kg/m²)
 - Terapia con statine o altri farmaci o integratori che potessero influenzare il metabolismo lipidico.

Alla visita di screening al paziente è stato presentato lo studio nelle sue finalità e, nel suo disegno, è stata richiesta la firma del consenso informato e quindi è stata proposta una dieta di stabilizzazione di tipo mediterraneo isocalorico per 14 giorni, con consigli personalizzati sulla base della somministrazione estemporanea del questionario validato "Dietary Quality Index"(12). Alla visita successiva è stato valutato l'assetto lipidico per capire se il paziente era ancora aderente ai criteri di inclusione ed esclusione prefissati, se confermava la volontà di partecipare allo studio e quindi gli è stata fornita una quantità di prodotto sufficiente a coprire i seguenti 60 giorni con una compressa/die. La compressa doveva essere presa alla sera. L'integratore dietetico utilizzato, Eufortyn colesterolo plus, è costituito da una frazione polifenolica fitosomale di bergamotto

(Vazguard®), estratto standardizzato di carciofo (Pycrinil®), coenzima Q10 ad alta biodisponibilità e zinco.

Vazguard® è l'estratto secco dei polifenoli del *Citrus bergamia* Risso, in forma di fitosoma, utile nella modulazione positiva dei lipidi plasmatici. Il bergamotto appartiene alla famiglia delle Rutacee ed è una pianta endemica della costa Jonica della Calabria il cui succo presenta un'alta concentrazione di sostanze naturali, tra cui i flavonoidi. È un agrume con un profilo unico di sostanze naturali (flavonoidi, in particolare neoeriocitrina, neoesperidina, naringina, brutieridina, melitidina) presenti sia nel succo che nella pellicola interna della buccia. Proprio la composizione chimica di questi flavonoidi, e in particolare la frazione BPF® (succo essiccato di Bergamotto), differenzia questo agrume.

Il Fitosoma è un sistema veicolare di lecitina che rende i flavonoidi del bergamotto più solubili e quindi più facilmente assorbibili dall'organismo.

L'estratto standardizzato di carciofo contribuisce al normale metabolismo dei lipidi ed al mantenimento della normale funzione epatica e digestiva.

Lo zinco contribuisce al normale metabolismo dei carboidrati, degli acidi grassi e protegge le cellule dallo stress ossidativo. Lo zinco è un componente di centinaia di complessi enzimatici coinvolti nel metabolismo di proteine, lipidi, carboidrati e acidi nucleici.

Al paziente è stato inoltre chiesto di non modificare (salvo necessità specifiche ed avvertendo lo sperimentatore) l'eventuale terapia sottostante nel corso dello studio.

I dati raccolti nelle visite previste dallo studio sono stati i seguenti:

- Dati anagrafici (solo in T₋₁₄)
- Storia personale di malattia cardiovascolare (solo in T₋₁₄)
- Anamnesi farmacologica
- Peso/Altezza/Circonferenza vita/Indice di obesità centrale/BMI
- Pressione arteriosa sistolica misurata in orto- e clinostatismo (media di 3 misurazioni intervallate)
- Pressione arteriosa diastolica misurata in orto- e clinostatismo (media di 3 misurazioni intervallate)
- Pressione arteriosa di polso e media (derivate dalle precedenti)
- Assetto lipidico completo (colesterolemia totale, colesterolemia LDL, colesterolemia HDL, colesterolemia non HDL, trigliceridemia, rapporti di rischio, apolipoproteina B, LDL-C/apoB)
- Glicemia basale, Transaminasi, gamma-GT, CPK
- Uricemia, Creatininemia, Velocità di filtrazione glomerulare stimata

Valori dei parametri di efficacia (media±SD) alla visita di screening (T₋₁₄), alla baseline (T₀) e post-trattamento (T₅₆)

	T ₋₁₄	T ₀	T ₅₆
Indice di Massa Corporea (kg/m ²)	26,9±1,9	26,5±1,6	26,4±1,7
Circonferenza Vita (cm)	93±8	92±8	90±9
Pressione sistolica (mmHg)	129±9	127±10	127±9
Pressione diastolica (mmHg)	83±7	82±8	81±6
Glicemia basale (mg/dl)	106±9	105±7	101±5*
Colesterolemia totale (mg/dl)	211±15	209±15	175±13*
Trigliceridemia (mg/dl)	185±21	179±23	151±16*
Colesterolemia HDL (mg/dl)	43±3	45±4	44±4
Colesterolemia LDL (mg/dl)	132±11	124±12	101±8*
Colesterolemia Non HDL (mg/dl)	168±13	166±14	131±13*
ApoB (mg/dl)	92±11	94±10	88±19*
ApoB/LDL	0,7±0,3	0,7±0,2	0,7±0,3

*p<0,05 vs. baseline

Tab. 1

Valori dei parametri di sicurezza (media±SD) alla visita di screening (T₋₁₄), alla baseline (T₀) e post-trattamento (T₅₆)

	T ₋₁₄	T ₀	T ₅₆
GOT (U/l)	21±6	20±3	16±5*
GPT (U/l)	23±7	22±4	17±3*
Gamma-GT (U/l)	28±9	27±7	24±6*
Uricemia (mg/dl)	5,2±2,3	4,8±3,1	4,7±2,9
Creatinina (mg/dl)	0,9±0,2	0,8±0,3	0,9±0,1
VFR stimata (ml/min)	94±4	95±5	96±5
Creatinin-fosfo-chinasi (U/l)	125±18	138±21	129±22

*p<0,05 vs. baseline

Tab. 2

- Valutazione qualitativa della dieta alla baseline e in corso di trattamento

- Compliance al trattamento (misurata sulla base del numero di compresse riportate nel flacone distribuito tarato per il numero di giorni di trattamento teorico)

- Accettabilità soggettiva del trattamento

Tutti i parametri di laboratorio sono stati analizzati su sangue periferico raccolto dopo 12 ore di digiuno ed analizzati con metodiche standardizzate presso il laboratorio lipidologico afferente al Dipartimento di Scienze mediche e chirurgiche dell'Alma Mater Studiorum Università di Bologna.

Lo studio è stato condotto nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki e delle sue successive modificazioni.

Da un punto di vista statistico, è stata condotta un'analisi descrittiva completa dei parametri studiati, poi confronti pre- e post-trattamento con test per campioni appaiati, parametrici o non parametrici a seconda della distribuzione dei parametri stessi. Un livello di significatività di p<0,05 è stato considerato accettabile per i test condotti. Calcolo della percentuale di responders valutata in termini di % di soggetti che sotto trattamento hanno sperimentato riduzione della colesterolemia LDL>15%. Tutti i test sono stati condotti col supporto del software Statistical Package for Social Sciences.

Risultati

La compliance al trattamento è stata del 100%. Nessun soggetto ha lamentato disturbi soggettivi o eventi avversi di altro tipo. Un solo paziente ha lamentato difficoltà alla deglutizione che tuttavia non ha impedito l'assunzione delle compresse.

I livelli medi dei parametri studiati sono riportati in tabella 1 (parametri di efficacia) (Figura 1) e tabella 2 (parametri di sicurezza) (Figura 2). Nessun parametro si è modificato fra la visita di screening e l'inizio dell'assunzione dell'integratore testato. Fra valori basali e post-test, non si sono osservate variazioni significative per quanto riguarda parametri antropometrici, pressione arteriosa,

Valori dei principali parametri di efficacia alla visita basale (T₀) e post-trattamento (T₅₆)

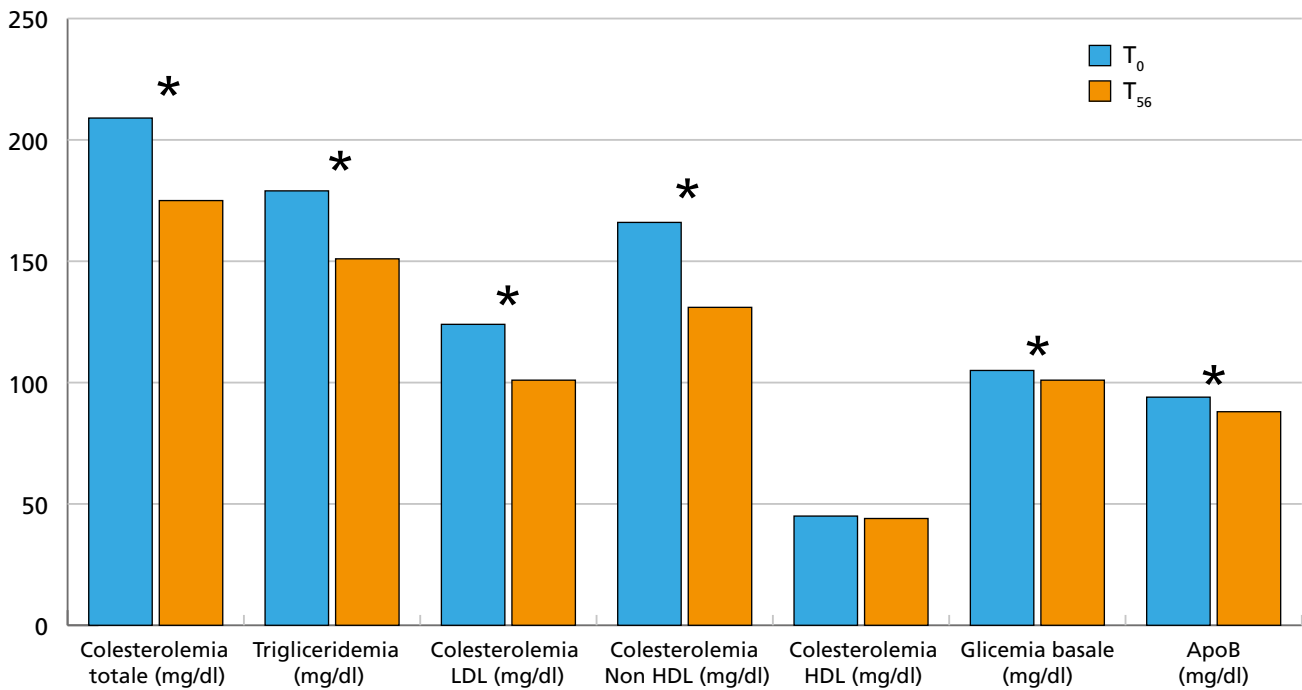
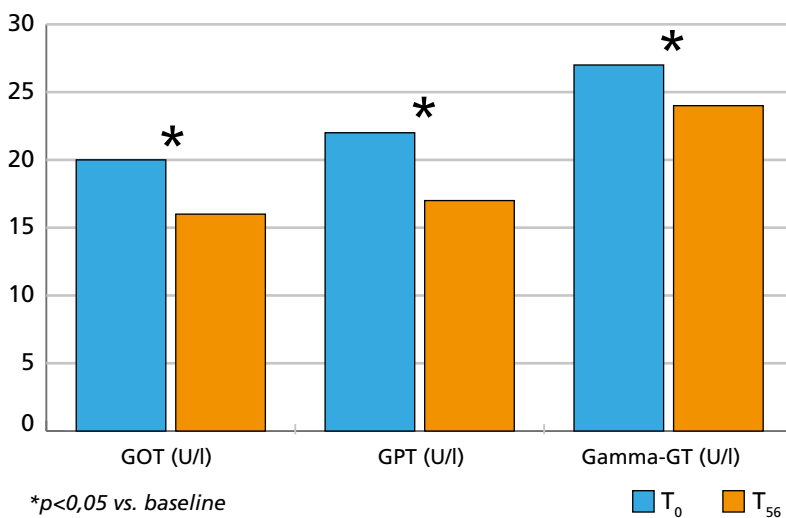


Fig. 1

*p<0,05 vs. baseline

Valori dei parametri di sicurezza alla visita basale (T₀) e post-trattamento (T₅₆)



*p<0,05 vs. baseline

Fig. 2

uricemia, funzionalità renale e livelli plasmatici di CPK. Si sono invece ridotti in modo significativo i seguenti parametri: glicemia (-3,8%), Colesterolemia totale (-16,3%), Colesterolemia LDL (-18,5%), Colesterolemia non HDL (-12,7%), apoB (-6,4%), Trigliceridemia (-15,6%), GOT (-20%), GPT (-21,7%), e gamma-GT (-11%) (Figura 3). Il numero di responders valutato in termini di percentuale di soggetti che sotto trattamento hanno sperimentato riduzione della colesterolemia LDL>15% è stato del 67%. I risultati osservati devono ovviamente essere valutati con criticità, dato il disegno in aperto dello studio, la breve durata di esposizione dei soggetti arruolati al prodotto attivo e la piccola numerosità campionaria. Tuttavia uno degli aspetti positivi di questo studio è stato l'arruolamento in un setting specialistico a cui i pazienti usualmente af-

Riduzione dei principali parametri tra i valori basali e post-trattamento (T₅₆)

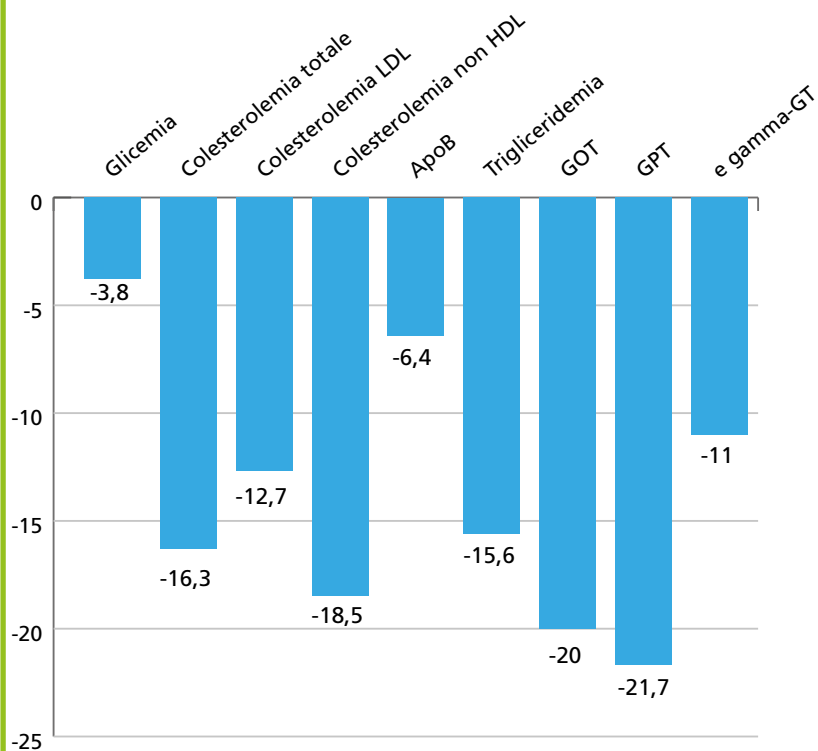


Fig. 3

feriscono quando già sensibilizzati alle modificazioni dello stile di vita necessarie a migliorare il proprio pattern metabolico. L'ulteriore periodo di run-in pre-arruolamento ha consentito di evitare aberrazioni comportamentali nel corso dello studio.

Discussione

La letteratura scientifica si sta arricchendo di dati circa l'efficacia ipocolesterolemizzante di prodotti nutraceutici combinati (13,14), includendo fra questi tuttavia quasi solo prodotti contenenti riso rosso fermentato. Fra questi i più studiati sono le associazioni riso rosso fermentato-berberina (15) riso rosso fermentato-fitosteroli (16) e riso rosso fermentato-acidi grassi polinsaturi della serie omega 3 (17). In questo studio pilota è stato osservato un effetto positivo di un nutraceutico combinato non contenente riso rosso fermentato su di un ampio numero di parametri lipidici correlati al rischio di sviluppare malattie cardiovascolari:

colesterolemia totale, colesterolemia LDL, colesterolemia non-HDL, apolipoproteina B, e trigliceridemia. I risultati del nostro studio pilota confermano quanto atteso da letteratura (18,19). Infatti, in precedenza, sia l'estratto di bergamotto (standardizzato per frazione flavonoidica) fitosomizzato che l'estratto di carciofo testati avevano singolarmente dimostrato in alcuni studi clinici di migliorare l'assetto lipidico in soggetti affetti da dislipidemia moderata (20, 21). Nel nostro studio è anche stata osservata una lieve ma significativa riduzione della glicemia, che, associata a riduzione di transaminasi e gamma-GT suggerisce una conferma anche del blando effetto positivo di questi estratti in termini di miglioramento dell'insulino-resistenza (22). L'assenza di effetti su funzionalità renale e parametri muscolari, nonché effetti positivi sugli indici di citonecrosi hanno dato conferma della tollerabilità del prodotto testato. Ovviamente questo dato dovrà essere confermato su casistiche più ampie e nell'ambito di studi clinici randomizzati e controllati contro placebo.

L'effetto combinato di più ingredienti naturali attivi su diverse vie metaboliche ed assumibile in monosomministrazione può costituire, in associazione alla modificazione dello stile di vita in senso salutistico, un mezzo razionale per la gestione di soggetti

affetti da più condizioni che, seppure a livello subclinico, possano predisporre ad un aumentato rischio di malattie cardiovascolari (23).

Questo studio, per la sua natura di studio pilota, ha alcuni limiti intrinseci: la numerosità campionaria è stata bassa, la durata dell'esposizione agli attivi breve e manca un gruppo di controllo. Tuttavia, la finalità dello studio era verificare preliminarmente in una condizione di pratica clinica reale se l'integratore testato potesse esercitare un'azione metabolica laboratoristicamente misurabile su di un ampio numero di parametri lipidici. La quantificazione di un effetto di un prodotto non precedentemente testato è infatti fondamentale per poter calcolare la numerosità da studiare in uno studio controllato in doppio cieco. Inoltre la durata di esposizione è stata scelta come rappresentativa del tempo standard usualmente atteso da medici e pazienti per verificare l'efficacia di un nutraceutico ad azione ipolipemizzante.

Conclusion

Lo studio clinico preliminare condotto mostra come la formulazione nutraceutica testata sia in grado di migliorare significativamente i livelli plasmatici di colesterolemia to-

tale, LDL e non-HDL nella maggior parte dei soggetti arruolati. Il contemporaneo miglioramento di glicemia basale, transaminasi e γ GT fanno supporre un impatto positivo sull'insulino-sensibilità.

BIBLIOGRAFIA

1. Ference BA, Mahajan N. The role of early LDL lowering to prevent the onset of atherosclerotic disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(4):312.
2. Authors/Task Force Members; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG); ESC National Cardiac Societies. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2019;290:140-205.
3. Hobbs FD, Banach M, Mikhailidis DP, Malhotra A, Capewell S. Is statin-modified reduction in lipids the most important preventive therapy for cardiovascular disease? A pro/con debate. *BMC Med* 2016; 14: 4
4. Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al.; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective metaanalysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366: 1267-78.
5. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, et al.; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 2010; 376: 1670-81.
6. Cicero AFG, Colletti A, Bajraktari G, Descamps O, Djuric DM, Ezhov M, Fras Z, Katsiki N, Langlois M, Latkovskis G, Panagiotakos DB, Paragh G, Mikhailidis DP, Mitchenko O, Paulweber B, Pella D, Pitsavos C, Reiner Ž, Ray KK, Rizzo M, Sahebkar A, Serban MC, Sperling LS, Toth PP, Vinereanu D, Vrablik M, Wong ND, Banach M. Lipid-lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel. *Nutr Rev.* 2017;75(9):731-767.
7. Savarese G, De Ferrari GM, Rosano GM, Perrone-Filardi P. Safety and efficacy of ezetimibe: A meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2015; 201:247-52.
8. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res.* 2014; 88:3-11.
9. Pokrywka GS. PCSK9 inhibitors: a non-statin cholesterol-lowering treatment Option. *Postgrad Med.* 2018;130(3):287-298.
10. Poli A, Barbagallo CM, Cicero AFG, Corsini A, Manzato E, Trimarco B, Bernini F, Visioli F, Bianchi A, Canzone G, Crescini C, de Kreutzenberg S, Ferrara N, Gambacciani M, Ghiselli A, Lubrano C, Marelli G, Marrocco W, Montemurro V, Parretti D, Pedretti R, Perticone F, Stella R, Marangoni F. Nutraceuticals and functional foods for the control of plasma cholesterol levels. An intersociety position paper. *Pharmacol Res.* 2018; 134:51-60.
11. Cicero AFG, Fogacci F, Bove M, Giovannini M, Borghi C. Three-arm, placebo-controlled, randomized clinical trial evaluating the metabolic effect of a combined nutraceutical containing a bergamot standardized flavonoid extract in dyslipidemic overweight subjects. *Phytother Res.* 2019;33(8):2094-2101.
12. Kourlaba G, Panagiotakos DB. Dietary quality indices and human health: a review. *Maturitas.* 2009;62(1):1-8.
13. Cicero AF, Colletti A. Combinations of phytomedicines with different lipid lowering activity for dyslipidemia management: The available clinical data. *Phytomedicine.* 2016;23(11):1113-8.
14. Banach M, Patti AM, Giglio RV, Cicero AFG, Atanasov AG, Bajraktari G, Bruckert E, Descamps O, Djuric DM, Ezhov M, Fras Z, von Haehling S, Katsiki N, Langlois M, Latkovskis G, Mancini GBJ, Mikhailidis DP, Mitchenko O, Moriarty PM, Muntner P, Nikolic D, Panagiotakos DB, Paragh G, Paulweber B, Pella D, Pitsavos C, Reiner Ž, Rosano GMC, Rosenson RS, Rysz J, Sahebkar A, Serban MC, Vinereanu D, Vrablik M, Watts GF, Wong ND, Rizzo M; International Lipid Expert Panel (ILEP). The Role of Nutraceuticals in Statin Intolerant Patients. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(1):96-118.
15. Millán J, Cicero AF, Torres F, Anguera A. Effects of a nutraceutical combination containing berberine (BRB), policosanol, and red yeast rice (RYR), on lipid profile in hypercholesterolemic patients: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Clin Investig Arterioscler.* 2016;28(4):178-87.
16. Cicero AFG, Fogacci F, Rosticci M, Parini A, Giovannini M, Veronesi M, D'Addato S, Borghi C. Effect of a short-term dietary supplementation with phytosterols, red yeast rice or both on lipid pattern in moderately hypercholesterolemic subjects: a three-arm, double-blind, randomized clinical trial. *Nutr Metab.* 2017;14:61.
17. Cicero AF, Derosa G, Pisciotta L, Barbagallo C; SISA-PUFACOL Study Group. Testing the Short-Term Efficacy of a Lipid-Lowering Nutraceutical in the Setting of Clinical Practice: A Multicenter Study. *J Med Food.* 2015;18(11):1270-3.
18. Santos HO, Bueno AA, Mota JF. The effect of artichoke on lipid profile: A review of possible mechanisms of action. *Pharmacol Res.* 2018; 137:170-178.
19. Cappello AR, Dolce V, Iacopetta D, Martello M, Fiorillo M, Curcio R, Muto L, Dhanyalayam D. Bergamot (Citrus bergamia Risso) Flavonoids and Their Potential Benefits in Human Hyperlipidemia and Atherosclerosis: an Overview. *Mini Rev Med Chem.* 2016;16(8):619-29.
20. Rondanelli M, Castellazzi AM, Riva A, Allegrini P, Faliva MA, Peroni G, Naso M, Nichetti M, Tagliacarne C, Valsecchi C, Fazio T, Perna S, Graziano F, Grassi M, Bernardinelli L. Natural Killer Response and Lipo-Metabolic Profile in Adults with Low HDL-Cholesterol and Mild Hypercholesterolemia: Beneficial Effects of Artichoke Leaf Extract Supplementation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019;2019:2069701.
21. Mollace V, Scicchitano M, Paone S, Casale F, Calandrucchio C, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J, Nucera S, Riva A, Allegrini P, Ronchi M, Petrangolini G, Bombardelli E. Hypoglycemic and Hypolipemic Effects of a New Lecithin Formulation of Bergamot Polyphenolic Fraction: A Double Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2019; 19(2):136-143.
22. Ben Salem M, Affes H, Ksouda K, Dhoubi R, Sahnoun Z, Hammami S, Zeghal KM. Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2015;70(4):441-53.
23. Patti AM, Al-Rasadi K, Giglio RV, Nikolic D, Mannina C, Castellino G, Chianetta R, Banach M, Cicero AFG, Lippi G, Montalto G, Rizzo M, Toth PP. Natural approaches in metabolic syndrome management. *Arch Med Sci.* 2018;14(2):422-441.

Sviluppo tecnologico di un acido ialuronico ad ampio spettro di pesi molecolari e ad alta biodisponibilità

Technological development of a hyaluronic acid with a large spectrum of molecular weight and high bioavailability

Fabrizio Francomano, Francesco Puoci, Fabio Amone

Dipartimento di Farmacia e Scienze della salute e della nutrizione, Università della Calabria Rende (CS) -Italia-

Titolo: La tecnologia *Full spectrum technology* rispetto all'acido ialuronico standard: risultati preliminari promettono una migliore efficacia, grazie alla fine modulazione dei processi biochimici che regolano l'equilibrio tra omeostasi e infiammazione.

Title: *The Full spectrum technology versus standard hyaluronic acid: preliminary results promise higher efficacy performance due to fine tuning capacity over biochemical pathways for balancing homeostasis and inflammation.*

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a natural polymer, which is found, above all, in connective tissues. It is mainly used for the treatment of joint pathologies and to reduce wrinkles as an injectable medical device. In the body, hyaluronic acid is found as a polymer with different molecular weights (high: HMW HA; low: LMW HA). In vitro studies have demonstrated that LMW HA has a higher bioavailability, but they are less resistant to hyaluronidase degradation. Anti-inflammatory activity depends on the incubation time and from the polymer length. HA antioxidant activity is higher for LMW. In vivo absorption studies show better bioavailability pattern for LMW in the short time, but they suggest an activation of HA in time, which bring to an increase of HA blood concentration, whatever molecular weight considered.

These studies and literature data have brought to Full Spec-

trum Technology development, which consists of a specific HA spectrum of targeted defined molecular weights. Particularly, one of the cosmetic product coming from this technology is Principhyal® Cube³, which has shown in an ex vivo model of human reconstructed epidermis, to have a better absorption than the LMW and the HMW taken alone.

Key words: *hyaluronic acid; sodium hyaluronate; Full spectrum technology; LMW; HMW; Cube³; percutaneous absorption; skin.*

Abstract

L'acido ialuronico (HA) è un polimero naturale, che si trova soprattutto nei tessuti connettivi. Esso viene utilizzato come dispositivo medico iniettabile principalmente per il trattamento di patologie articolari e per ridurre le rughe. Nell'organismo, l'acido ialuronico è presente sotto forma di polimero di differenti pesi molecolari (alto: HMW, basso: LMW e polimeri intermedi). Studi *in vitro* hanno dimostrato che quelli con peso molecolare inferiore hanno una migliore biodisponibilità, ma sono meno resistenti alla degradazione della ialuronidasi. L'attività anti-infiammatoria varia in funzione del tempo di incubazione e dipende dal grado di polimerizzazione, mentre quella antiossidante è superiore per i bassi pesi molecolari. Studi di assorbimento *in vivo* mostrano pattern di biodisponibilità migliori per i bassi pesi molecolari nel breve termine, ma suggeriri-

scono un'attivazione dell'acido ialuronico nel tempo che comporta l'aumento della concentrazione nel sangue e prescinde dal peso molecolare. Le evidenze provenienti da questi studi e da dati di letteratura hanno portato allo sviluppo della *Full spectrum technology*, che consiste in un acido ialuronico caratterizzato da uno spettro specifico di pesi molecolari per target definiti. In particolare, un prodotto cosmetico derivante da tale tecnologia Principhyal® Cube³, ha mostrato in un modello *ex vivo* di epidermide umana ricostruita di avere un assorbimento percutaneo maggiore rispetto a sodio ialuronato a basso e ad alto peso molecolare presi singolarmente.

Parole chiave: acido ialuronico; sodio ialuronato; Full spectrum technology; LMW; HMW; Principhyal® Cube³; assorbimento percutaneo; pelle.

Introduzione

L'acido ialuronico (HA) è una sostanza naturale isolata per la prima volta nel 1934 da Karl Meyer e John Palmer, a partire dall'umor vitreo di occhio bovino. (1). Questo composto è un polisaccaride, precisamente un glicosamminoglicano non sulfonato, costituito da monomeri alternati di N-acetilglucosammina e acido glucuronico, uniti mediante legami glicosidici β -1,4 e β -1,3 (Figura 1). È un polimero lineare, con un elevato peso molecolare.

L'acido ialuronico è presente nell'uomo, negli animali, nei batteri, nelle alghe e nei lieviti. È un importante costituente della matrice extracellulare e nell'uomo si trova nei tessuti connettivo, epiteliale e nervoso (2, 3, 4).

Esso viene sintetizzato attraverso una reazione biochimica consistente nella polimerizzazione di acido glucuronico e N-acetilglucosammina e catalizzata dall'enzima ialuronato

sintasi (HAS), presente sotto forma di tre isoenzimi, HAS-1, HAS-2 e HAS-3, i quali producono polimeri di acido ialuronico di differente peso molecolare.

L'acido ialuronico è caratterizzato da elevate viscoelasticità, biocompatibilità, igroscopicità e capacità di ritenzione dell'acqua, dovuta all'elevata polarità. Infatti è presente nell'uomo sotto forma di sali (ialuronati) di sodio, calcio, magnesio o potassio, gruppi polari che rendono la macromolecola capace di legare acqua.

Dal punto di vista biologico, questo polimero è coinvolto in numerosi processi cellulari, come la differenziazione, la proliferazione, lo sviluppo, la migrazione, il riconoscimento cellula-cellula (2).

Le proprietà chimico-fisiche delle soluzioni di acido ialuronico, inoltre, sono influenzate dalla sua concentrazione e dal relativo peso molecolare (MW) (2).

Tra le più importanti azioni biologiche esercitate dall'acido ialuronico ad alto peso molecolare (HMW HA con MW > 10⁶ Da) rientrano quella lubrificante (ad esempio nel liquido sinoviale), quella immunosoppressiva e quella angiogenica (6). Inoltre, la macromolecola è coinvolta nei processi infiammatori, nella riparazione dei tessuti e nella guarigione delle ferite (6). In alcune condizioni patologiche, quali l'artrite reumatoide, l'ipertensione e alcune patologie polmonari, l'HMW HA viene convertito in acido ialuronico a basso peso molecolare (LMW HA), con MW compreso tra 210⁴ Da e 10⁶ Da (7), è in grado di rimodellare la matrice extracellulare e con attività pro-infiammatoria e pro-angiogenica (6, 8).

L'acido ialuronico è stato nel tempo oggetto di molte ricerche e studi, ma in letteratura vi sono scarsi esempi di test clinici sull'uomo, ancor meno relativi al suo uso orale.

Per via intra-articolare, il polimero si è rivelato efficace

nella prevenzione e nel trattamento dell'osteoartrite, una patologia caratterizzata da depolimerizzazione dell'acido ialuronico. (2, 9-15). Pochi dati raccolti dallo stesso autore hanno riportato che l'acido ialuronico è in grado di idratare la pelle danneggiata da raggi UV, fumo e sostanze inquinanti, fattori che riducono la quantità di acido ialuronico nella pelle, inibendo la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi endogena dello stesso (16, 17, 18).

Nonostante la carenza di dati di efficacia, la sicurezza intrinseca del prodotto dovuta alla sua ubiquità in diversi tessuti umani, ha fatto sì che lo stesso venisse commercializzato

Struttura dell'acido ialuronico

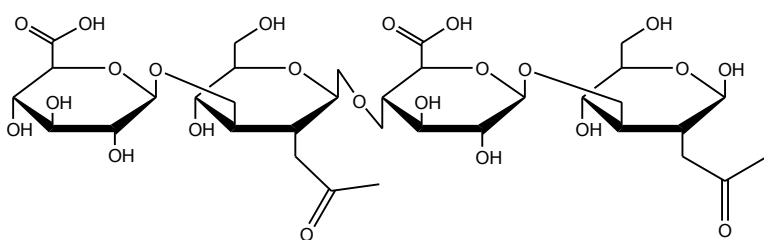


Fig. 1

come integratore alimentare negli Stati Uniti e in Europa, per il dolore alle articolazioni (9) in pazienti affetti da osteoartrite, e in Giappone per l'idratazione della pelle e il trattamento delle rughe (2, 19, 20). Oggi il valore del mercato globale dell'acido ialuronico ammonta a circa 8.3 miliardi di dollari (dati 2018) ed è proiettato a crescere ad un tasso annuale del 7,8% fino al 2026. Il settore nutraceutico costituisce solo il 10% di questo e muove circa 80 tonnellate solo in Europa, mentre i settori ad oggi più sviluppati sono quello cosmetico (15%) e farmaceutico (45%).

Ad oggi sono pochi gli studi sulla farmacocinetica dell'acido ialuronico in ambito umano. In uno dei primi studi fatto sull'uomo, era stato riscontrato che l'emivita plasmatica del composto, in seguito a iniezione di HMW HA marcato con trizio, era compresa tra 2,5 e 5,5 minuti (21), pertanto è possibile supporre che il composto non abbia un'elevata biodisponibilità orale. Tuttavia, è stato visto che, dopo somministrazione orale di HMW HA marcato radioattivamente con tecnezio in ratti Wistar e cani Beagle la macromolecola era in grado di accumularsi nelle articolazioni, nelle vertebre, nella pelle e nelle ghiandole salivari, verosimilmente attraverso il sistema linfatico e non il flusso sanguigno (22). È stato inoltre ipotizzato che l'acido ialuronico fosse idrolizzato nel sistema digerente e i frammenti del polisaccaride venissero assorbiti - come dimostrato in uno studio sui topi (23) - per essere successivamente riuniti a formare acido ialuronico (22). Questo spiegherebbe le maggiori concentrazioni della macromolecola in alcuni tessuti rispetto ai livelli plasmatici. Il peso molecolare è un fattore chiave per l'entità dell'assorbimento, il quale è dose-dipendente e inversamente proporzionale al peso molecolare (24). L'acido ialuronico non si accumula in maniera significativa a livello plasmatico (2).

Materiali e metodi

Materiali

Negli esperimenti *in vitro*, volti a valutare biodisponibilità, effetto antinfiammatorio, effetto antiossidante e stabilità dell'HA, sono stati testati i seguenti ingredienti a base di HA con peso molecolare standardizzato:

ExceptionHYAL® HW (1,8 – 2,2 MDa);

ExceptionHYAL® MW (1,0 – 1,8 MDa);

ExceptionHYAL® LW (200 – 600 kDa);

ExceptionHYAL® XLW (50 – 200 kDa).

Nello studio sulla biodisponibilità nell'uomo sono stati testati solamente HW, MW e XLW.

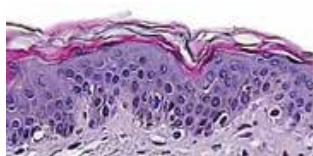
Nello studio relativo all'assorbimento percutaneo è stata utilizzata una materia prima costituita da sodio ialuronato a differente peso molecolare (*Full spectrum*) denominato Principhyal® Cube³. Il composto, costituito da una polvere bianca solubile in acqua, è stato utilizzato ad una concentrazione dello 0,5% e miscelato per creare una crema base con i seguenti ingredienti: acqua, PEG-6 stearato, ciclopentasilossano, isononil isononanoato, PEG-32 stearato, gliceril stearato, glicol stearato, disodio EDTA, gomma xantana, magnesio nitrato, magnesio cloruro, trietanolammina, metilcloroisotiazolinone, metilisotiazolinone. Come riferimento, sono state utilizzate due creme base contenenti sodio ialuronato LMW e HMW alle stesse concentrazioni della materia prima in esame.

Per valutare l'efficacia dell'ingrediente secondo tecnologia *Full Spectrum* rispetto agli ingredienti standard, i prodotti sono stati testati su un modello di epidermide umana ricostruita (RHE- Skinethic Laboratories, Francia) costituito da normali cheratinociti umani in coltura su un filtro inerte di policarbonato all'interfaccia aria-liquido.

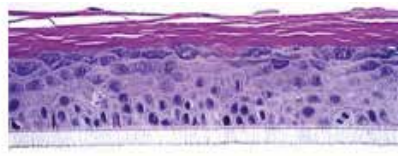
Tale modello è formato da tessuto multistrato vivo, molto simile all'organizzazione dell'epidermide umana *in vivo* (Figura 2).

Il modello esprime i maggiori marker di differenziazione (filaggrina e involucrina negli strati di cellule laminari, transglutaminasi I e cheratina 10 negli strati di cellule soprabasali, loricrina negli strati di cellule granulari superiori) e di membrana basale (collagene di tipo IV, integrina $\alpha 6$ e $\beta 4$, laminina I e V, antigene BP). Tra i lipidi sono presenti acidi grassi liberi e ceramidi. Il modello presenta normale secrezione e organizzazione del contenuto del bilayer negli spazi intercellulari degli strati che-

Struttura dell'epidermide in vivo e struttura dell'epidermide ricostruita



in vivo



ex vivo

Fig. 2

ratizzati, con formazione di una normale barriera di permeabilità (25-35).

Sono state eseguite delle procedure di controllo di qualità. Su un pellet di cellule dello stesso ceppo, è stata verificata l'assenza di HIV-DNA pro-virale integrato e di DNA virale di epatite C, mediante analisi PCR. Sul surnatante della coltura, è stata verificata l'assenza di antigeni HBs dell'epatite B, di batteri, funghi e micoplasmi.

Valutazione della biodisponibilità in fluidi che simulano i fluidi gastrointestinali

2,5 g di ogni campione e 1,0 mL di una soluzione di HCl 0,85 M contenente 24000 U di pepsina di maiale per mL sono stati miscelati e vortexati. Il materiale è stato trasferito quantitativamente nei tubi per dialisi (18 cm di lunghezza, 1,6 cm di diametro, limite di peso molecolare: 12000-14000, Sigma Chemical Co.) e incubato in un bagno d'acqua (20 mL) a 39 °C per 120 minuti. Dopo il periodo di incubazione della pepsina, la quantità di HA assorbito è stata determinata per via spettrofotometrica (36). Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato.

Alla fine dei 120 minuti di digestione della pepsina, i campioni sono stati trasferiti quantitativamente nei tubi per dialisi e 1,3 mL di una soluzione di NaHCO₃ 0,8 M, contenente 22,60 mg di pancreatina di maiale per mL (8 x USP) sono stati miscelati al materiale digerito in precedenza. Il tubo per dialisi è stato, quindi, sigillato con un morsetto su ogni estremità. Esso (18 cm di lunghezza, 1,6 cm di diametro, limite di peso molecolare: 12000-14000, Sigma Chemical Co.) è stato posto in una beuta da 50 mL contenente 20 mL di soluzione di succinato 0,05 M. I campioni sono stati incubati a 39 °C a 120 rpm per 6, 12 e 24 ore. Dopo il tempo di incubazione della pancreatina, la quantità di HA idrolizzato è stata determinata per via spettrofotometrica (36). Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato.

Valutazione dell'effetto antinfiammatorio

La quantità di radicale nitrossido (NO·), generato da nitroprussiato di sodio, è stata misurata secondo un metodo riportato in letteratura (37). La miscela di reazione (5,0 mL) contenente nitroprussiato di sodio (5 mM) in soluzione salina tampone fosfato (pH 7,3) è stata incubata a 25 °C per 180 minuti davanti a una fonte di luce visibile policromatica (25 W, lampada di tungsteno). Il radicale NO· così generato ha interagito con l'ossigeno per formare lo ione nitrito (NO²⁻), che è stato saggiato a intervalli di 30 minuti aggiungendo a 1,0 mL di soluzione di incubazione la stessa quantità di reattivo di Griess (1% sulfanilammide

in acido fosforico al 5% e naftiletilendiammina dicloridrato allo 0,1%). L'assorbanza del cromoforo (azocolorante viola) che si è formato durante la diazotazione degli ioni nitrito con sulfanilammide e il conseguente accoppiamento con naftiletilendiammina dicloridrato è stata misurata a 546 nm. Il nitrito è stato valutato utilizzando una curva standard basata su soluzioni di sodio nitrito a concentrazione nota. Ogni esperimento è stato condotto almeno 3 volte e i dati sono stati presentati come la media di 3 determinazioni indipendenti.

Valutazione dell'effetto antiossidante

Per la valutazione delle proprietà di *scavenging* di radicali liberi del campione, è stata misurata la reattività nei confronti del radicale libero 2,2'-difetil-1-picrilidrazile (DPPH) (38). A questo scopo, 30 mg di ogni campione sono stati dispersi in 6 mL di etanolo e poi 4 mL di soluzione etanolica di DPPH (1,2 mM). Il campione è stato incubato in un bagno d'acqua a 25 °C e, dopo 15 minuti, l'assorbanza del DPPH rimanente è stata determinata colorimetricamente a 517 nm. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Valutazione della stabilità alla ialuronidasi

5 mL di una soluzione 5 mM di HA e 5 mL di acqua purificata sono stati incubati con 5 mL di 4,106 UI/mL di una soluzione contenente 4,106 UI/mL di ialuronidasi (HAasi) a 37 °C in un tubo per dialisi (39, 40). Le reazioni sono state fermate a 24 ore e la stabilità dell'HA nei confronti della ialuronidasi è stata valutata calcolando la percentuale di perdita di peso utilizzando l'equazione 1.

$$1-2 \cdot 100$$

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Valutazione dell'assorbimento/nell'uomo

Per valutare l'entità dell'assorbimento e della biodisponibilità di HA a diverso peso molecolare, è stato condotto uno studio di screening su 15 soggetti divisi in 3 gruppi da 5, che hanno assunto rispettivamente 200 mg dei prodotti ExceptionHYAL® XLW, ExceptionHYAL® MW ed ExceptionHYAL® HW. Prelievi ematici sono stati eseguiti sui soggetti a distanza di 2, 4, 6, 8, 10 e 24 ore dall'assunzione dell'integratore (T2h, T4h, T6h, T8h, T10h e T24h), per costruire una curva di assorbimento di HA tempo-dipendente. Valutati i livelli ematici di HA, è stato poi possibile procedere al dosaggio dei livelli di glicosamminoglicani sugli stessi campioni di plasma opportunamente conservati. Le analisi sono state svolte sui campioni ematici attraverso metodo CLIA (saggio di chemiluminescenza).

Valutazione della penetrazione del prodotto nel modello di RHE

I prodotti sono stati applicati al modello di RHE a 2,0 mg/cm² (per un totale di 1,0 mg di prodotto, contenenti 5 µg di Principhyal® Cube³ e dei riferimenti LMW e HMW) e incubati per 0,5, 2 e 24 ore in una camera termostata a 37 °C e con 5% di CO₂. Ad ogni intervallo di tempo sperimentale, il mezzo di coltura sotto l'RHE è stato raccolto e conservato a -80 °C per le successive analisi attraverso il test ELISA. Principhyal® Cube³ e i riferimenti sono stati quantificati lo stesso giorno utilizzando lo Hyaluronan Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Kit (K-1200, Tebu-bio).

Analisi statistica

L'entità della penetrazione dei prodotti è stata quantificata ed espressa come quantità totale in µg e come percentuale della quantità di prodotto nel mezzo di coltura rispetto al

prodotto applicato sulla superficie della pelle. I dati sono stati soggetti ad analisi statistica mediante il T-test per confronti a coppie. Le differenze sono considerate significative per $p < 0,05$.

Risultati e discussione

Dalla letteratura scientifica si riscontra che l'HA è presente nell'organismo sotto forma di molecole a diverso peso molecolare, le quali sono responsabili di numerosi processi fisiologici.

Studi *in vitro* condotti internamente su ingredienti a peso molecolare standardizzato (ExceptionHYAL® HW, MW, LW, XLW), hanno dimostrato che ciascun polimero esercita una diversa attività in merito a biodisponibilità, effetto antinfiammatorio, capacità antiossidante e resistenza alla degradazione enzimatica. Nel dettaglio, è stata valutata la biodisponibilità in fluidi che mimano il contenuto gastrointestinale.

È emerso che la biodisponibilità risultava essere migliore per le macromolecole a peso inferiore quali LW (compreso tra 200 e 600 kDa) e XLW (compreso tra 50 e 200 kDa) e considerevolmente inferiore per HW (compreso tra 1,8 e 2,2 MDa), a distanza di 2, 8, 16 e 24 ore, ma questa aumentava nel tempo per tutti i polimeri.

I dati sulla biodisponibilità sono riportati in Tabella 1. L'effetto antinfiammatorio è stato espresso come attività *scavenging* percentuale del radicale nitrossido (NO·), che reagisce con l'anione superossido a formare l'anione perossinitrito, un forte ossidante (37) che induce anche danno infiammatorio.

Dopo 2 ore, l'attività di *scavenging* risultava essere inversamente proporzionale al peso molecolare, mentre, dopo 8, 16 e 24 ore, aumentava per HW e MW (compreso tra 1,0 e 1,8 MDa) e diminuiva per LW. Tale andamento suggerisce un'attivazione dei frammenti di HA con un determinato *range* di peso molecolare, in quanto evidente per LW e XLW nei primi stadi del test, ma ridotta a lungo termine e allo stesso tempo crescente per HW e MW dopo 8 ore. Questo trend è in linea con dati riportati in letteratura secondo cui oligomeri dell'HA esercitano attività pro-infiammatoria (6).

I dati sull'effetto antinfiammatorio sono schematizzati in Tabella 2.

Valori di biodisponibilità dei 4 ingredienti dopo 2, 8, 16 e 24 ore

HA	Biodisponibilità (%)			
	2 h	8 h	16 h	24 h
HW	1 ± 0,1	8 ± 0,5	11 ± 0,4	15 ± 0,8
MW	4 ± 0,3	30 ± 0,4	43 ± 0,4	58 ± 0,8
LW	7 ± 0,4	47 ± 0,4	54 ± 1,1	71 ± 0,8
XLW	6 ± 0,4	46 ± 0,4	52 ± 0,9	68 ± 0,8

Tab. 1

Valori di attività di scavenging percentuale del radicale nitrossido

HA	Attività di scavenging % di NO·				
	T = 0	2 h	8 h	16 h	24 h
HW	16 ± 0,9	33 ± 0,7	80 ± 0,8	84 ± 0,9	76 ± 1,1
MW	17 ± 0,7	57 ± 0,9	79 ± 0,7	82 ± 1,0	76 ± 0,9
LW	19 ± 0,9	72 ± 1,2	67 ± 1,1	59 ± 1,1	53 ± 1,3
XLW	19 ± 1,1	73 ± 1,2	68 ± 0,9	61 ± 1,2	55 ± 0,7

Tab. 2

L'attività antiossidante, testata mediante il saggio spettrofotometrico del DPPH, è stata espressa come percentuale di inibizione del radicale DPPH. Questo valore è maggiore nel caso dei più bassi gradi di polimerizzazione quali LW ($12\% \pm 0,9\%$), se comparato a MW ($9\% \pm 0,8\%$). Infine, la stabilità delle preparazioni è stata valutata attraverso il trattamento con ialuronidasi, l'enzima che degrada l'HA, presente nella pelle e nell'intestino. La percentuale di degradazione del polimero è inversamente proporzionale al peso molecolare, quindi le molecole con peso molecolare più alto sono risultate più stabili all'azione della ialuronidasi a causa del maggiore ingombro sterico che ostacola l'interazione ottimale tra enzima e substrato. I valori di degradazione percentuale sono riportati in Tabella 3.

Inoltre, da uno studio pilota condotto somministrando nell'uomo, *per os*, 200 mg di ogni tipologia di HA, al fine di valutare l'assorbimento dell'HA a 3 differenti pesi

molecolari (ExceptionHYAL® XLW, MW e HW), è emerso che solo XLW mostra un picco di assorbimento tra 4 e 6 ore dopo la somministrazione, con una variazione massima rispetto al valore basale compresa tra il 34,7% ed il 39,9% rispettivamente. Diversamente, HW e MW non mostrano alcun picco di assorbimento evidente, ma dopo 12 ore mostrano un trend crescente nella concentrazione dell'HA nel sangue. Le Tabelle 4, 5 e 6 riportano i dati relativi alla biodisponibilità nell'uomo.

Risulta evidente, quindi, come il grado di polimerizzazione dell'HA influisca nettamente sulla prestazione dell'ingrediente, a seconda del modello di studio scelto e fornisca quindi *in vivo* una risposta fisiologica parziale o selettiva. Di contro, poiché la pelle, i tessuti connettivi e il liquido sinoviale sono costituiti da HA a diverso peso molecolare e tale fine composizione è responsabile dell'equilibrio tra omeostasi e infiammazione, si è ritenuto opportuno investigare l'efficacia di un prodotto che mimasse quanto più possibile la composizione dello spettro complesso di HA e non quello a peso molecolare specifico. A sostegno di questa ipotesi infatti, D'Agostino et al. hanno dimostrato *in vitro* la migliore prestazione di un complesso ibrido formato da HMW HA e LMW HA rispetto agli stessi presi singolarmente, in termini di velocità di guarigione delle ferite (maggiore espressione del collagene di tipo I e della metalloproteasi della matrice MMP-2) e di stabilità all'azione della ialuronidasi, sia a basse che ad alte concentrazioni (41).

In base allo stato fisiologico dell'epitelio, i recettori cellulari, specialmente CD44, riconoscono e legano i vari frammenti di HA. In particolare, in condizioni fisiologiche CD44 si lega a HMW HA. In condizioni di stress (infiam-

Valori di degradazione percentuale dopo trattamento con ialuronidasi dei 4 ingredienti

HA	Degradazione %
HW	21 ± 0.7
MW	57 ± 1.0
LW	67 ± 1.5
XLW	78 ± 1.2

Tab. 3

Dati di assorbimento/biodisponibilità. I dati sono riportati in ng/mL.

Tempo (h)		0	2	4	6	8	10	24
XLW	HA	74,83	81,73	100,81	104,65	83,21	57,19	109,93
	Totale	78,27	92,24	106,67	108,09	87,95	61,19	113,93
MW	HA	48,06	50,46	40,64	50,47	46,00	43,14	59,82
	Totale	54,11	56,13	51,34	55,40	50,93	48,44	68,47
HW	HA	64,69	51,79	51,35	62,92	40,41	42,56	79,75
	Totale	69,06	58,39	55,91	68,41	49,06	48,98	85,42

Tab. 4

mazione, radicali liberi, ecc.), HMW HA viene degradato, formando LMW HA, che si lega al recettore, riducendo l'effetto antimitogeno di CD44 e innescando il processo flogistico (42). Il complesso CD44-LMW HA attiva, quindi, la catena enzimatica Rac e la ciclina D1, inducendo proliferazione cellulare e infine spegnendo l'infiammazione. Col ritorno all'omeostasi, viene sintetizzato nuovo HMW HA, che ritorna a interagire con CD44 (42). Questa regolazione dei due diversi meccanismi permette alla cellula di reagire con più sensibilità, generando una risposta adattativa.

A partire da queste evidenze basate sui test svolti in Università della Calabria, ROELMI HPC ha sviluppato una nuova tecnologia, denominata *Full spectrum technology*, che non si basa sulla miscelazione di molecole di HA a diverso peso molecolare come nei test descritti in precedenza, ma che coinvolge il processo stesso di pro-

duzione dell'HA. Questo processo biotecnologico, viene modulato in termini di temperatura, tempo e pressione, per ottenere uno spettro di composti a differente peso molecolare e, soprattutto, viene modulato in continuo e non con step definiti. Si ottiene dunque un *range* di pesi molecolari che lavorano sinergicamente, come avviene normalmente nell'organismo, permettendo una modulazione dei processi fisiologici più complessa rispetto a quella che potrebbero svolgere le molecole di HA con unico peso molecolare.

L'assorbimento percutaneo di un ingrediente cosmetico prodotto con la tecnologia *Full spectrum* (Principhyal® Cube³), è stato confrontato con prodotti di HA a singolo peso molecolare, ovvero LMW e HMW, utilizzando un modello *ex vivo* di epidermide umana ricostruita. Si è osservato che sia a breve (mezz'ora) che a lungo termine (24 ore) la penetrazione di Principhyal® Cube³ è

Dati di assorbimento/biodisponibilità. I dati sono riportati come variazione % rispetto al T0

Tempo (h)		2	4	6	8	10	24
XLW	HA	9,2%	34,7%	39,9%	11,2%	-23,6%	46,9%
	GAG	205,4%	70,3%	0,0%	37,8%	16,2%	16,2%
	Totale	17,8%	36,3%	38,1%	12,4%	-21,8%	45,6%
MW	HA	5,0%	-15,4%	5,0%	-4,3%	-10,2%	24,5%
	GAG	-6,2%	76,9%	-18,5%	-18,5%	-12,3%	43,1%
	Totale	3,7%	-5,1%	2,4%	-5,9%	-10,5%	26,5%
HW	HA	-19,9%	-20,6%	-2,7%	-37,5%	-34,2%	23,3%
	GAG	51,1%	4,3%	25,5%	97,9%	46,8%	29,8%
	Totale	-15,4%	-19,0%	-0,9%	-29,0%	-29,1%	23,7%

Tab. 5

Livelli sierici di HA. I dati sono riportati in ng/mL

Tempo (h)		0	2	4	6	8	10	24
XLW	HA	58,25	83,61	59,30	79,35	76,41	75,5	78,11
MW	HA	43,54	49,21	41,54	59,28	49,51	72,61	51,74
HW	HA	56,89	55,41	45,62	50,52	49,27	59,92	50,25

Tab. 6

Penetrazione di RHE espressa come media \pm deviazione standard e percentuale

	0,5 ore		2 ore		24 ore	
	Media \pm deviazione standard	% di penetrazione	Media \pm deviazione standard	% di penetrazione	Media \pm deviazione standard	% di penetrazione
Cube ³	0,071 \pm 0,005	1,4%	0,137 \pm 0,007	2,7%	0,535 \pm 0,016	10,7%
LMW	0,060 \pm 0,003	1,2%	0,117 \pm 0,010	2,3%	0,345 \pm 0,030	6,9%
HMW	0,040 \pm 0,002	0,8%	0,074 \pm 0,005	1,5%	0,235 \pm 0,011	4,7%

Tab. 7

risultata nettamente superiore a quella di LMW e HMW, a parità di dosaggio applicato, come si evince dai dati in Tabella 7.

T-test per confronto a coppie - 0.5 ore:

0.5% Cube³ vs 0.5% LMW p = 0.307 ns

0.5% Cube³ vs 0.5% HMW p = 0.041 s

0.5% LMW vs 0.5% HMW p = 0.108 ns

T-test per confronto a coppie - 2 ore:

0.5% Cube³ vs 0.5% LMW p = 0.063 ns

0.5% Cube³ vs 0.5% HMW p = 0.015 s

0.5% LMW vs 0.5% HMW p = 0.051 ns

T-test per confronto a coppie - 24 ore:

0.5% Cube³ vs 0.5% LMW p = 0.032 s

0.5% Cube³ vs 0.5% HMW p = 0.007 s

0.5% LMW vs 0.5% HMW p = 0.015 s

s = variazione significativa

ns = variazione non significativa

Dai test *ex vivo* è emerso che, dopo ognuno degli intervalli di tempo, Principhyal® Cube³ ha avuto un grado di penetrazione maggiore rispetto ai due riferimenti LMW e HMW. Il confronto tra Principhyal® Cube³ e i due riferimenti è riportato in Tabella 8.

Conclusioni

L'HA, utilizzato in cosmetica e in nutraceutica per la capacità idratante sulla pelle, anti-aging e nella cura delle articolazioni, è presente nell'organismo sotto forma di diversi pesi molecolari, ognuno dei quali attiva pathway biochimici molto diversi. Studi *in vitro* e *ex vivo* hanno dimostrato che polimeri di HA a peso molecolare specifico, mostrano performance diverse in ciascun modello selezionato, rendendo impossibile la scelta di un determinato HA efficace a 360°. Difficilmente è possibile mimare questi meccanismi allo stesso tempo, somministrando per via orale o topica prodotti a peso molecolare standardizzato o miscele di essi.

Per rispondere a questa esigenza, è stata sviluppata la tecnologia *Full Spectrum*, al fine di creare prodotti a spettro specifico per ogni target, in termini di assorbimento ed efficacia.

Dai migliori dati di assorbimento percutaneo di Principhyal® Cube³, realizzato con la *Full spectrum technology*, rispetto a HA LW e HW, si ha un'ulteriore conferma della superiorità dei prodotti costituiti da un *range* di pesi molecolari di HA piuttosto che da HA a singolo peso molecolare. Alla luce di questi incoraggianti risultati, si rendono necessari trial clinici per dimostrare la performance di prodotti derivanti dalla *Full spectrum technology* sia in cosmetica, con applicazione topica, che nutraceutica, via assunzione orale.

Penetrazione di Cube³ rispetto a LMW e HMW espressa come aumento percentuale

	LMW	HMW
0,5 ore	+14,0%	+88,8%
2 ore	+19,6%	+80,0%
24 ore	+55,0%	+125,3%

Tab. 8

BIBLIOGRAFIA

- Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem.* 1934; 107: 629-634.
- Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front Vet Sci.* 2019; 6: 192.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during FSH-induced mucification. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 13840-13847.
- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997; 242(1): 27-33.
- Brown TJ, Thomas NK, Role of Hyaluronan Metabolism in the Initiation, Invasion, and Metastasis of Breast Cancer. *Hyaluronan in Cancer Biology.* 2009; 18: 341-360.
- Cyphert JM, Trempus CS, Garantziotis S. Size matters: Molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. *Int J Cell Biol.* 2015; 2015: 563818.
- Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci.* 2007; 80: 1921-1943.
- Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers.* 2018; 10(7): 701.
- Berenbaum F, Grifka J, Cazzaniga S, et al. A randomized, double-blind, controlled trial comparing two intraarticular hyaluronic acid preparations differing by their molecular weight in symptomatic knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71: 1454-1460.
- Waddell DD. Viscosupplementation with hyaluronan for osteoarthritis of the knee. Clinical efficacy and economic implications. *Drugs Aging.* 2007; 24: 629-642.
- Julovi SM, Ito H, Nishitani K, et al. Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-13 in human arthritic chondrocytes via CD44 and p38. *J Orthop Res.* 2011; 29: 258-264.
- Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, et al. Hyaluronan suppressed nitric oxide production in the meniscus and synovium of rabbit osteoarthritis model. *J Orthop Res.* 2001; 19: 500-503.
- Masuko K, Murata M, Yudoh K, et al. Anti-inflammatory effects of hyaluronan in arthritis therapy: not just for viscosity. *Int J Med.* 2009; 2: 77-81.
- Nelson FR, Zvirbulis RA, Zonca B, et al. The effects of an oral preparation containing hyaluronic acid (Oralvisc®) on obese knee osteoarthritis patients determined by pain, function, bradykinin, leptin, inflammatory cytokines, and heavy water analysis. *Rheumatol Int.* 2015; 35: 43-52.
- Tashiro T, Seino S, Sato T, et al. Oral administration of polymer hyaluronic acid alleviates symptoms of knee osteoarthritis: a double-blind, placebo-controlled study over a 12-month period. *Scientif World J.* 2012; 2012: 167928.
- Kawada C, Yoshida T, Yoshida H, et al. Ingested hyaluronan moisturizes dry skin. *Nutr J.* 2014; 13 (70).
- Kawada C, Yoshida T, Yoshida H, et al. Ingestion of hyaluronans (molecular weights 800 k and 300 k) improves dry skin conditions: A randomized, double blind, controlled study. *J Clin Biochem Nutr.* 2015; 56: 66-73.
- Kawada C, Kimura M, Masuda Y, Nomura Y. Oral administration of hyaluronan prevents skin dryness and epidermal thickening in ultraviolet irradiated hairless mice. *J Photochem Photobiol B.* 2015; 153: 215-221.
- Oe M, Mitsugi K, Odanaka W, et al. Dietary hyaluronic acid migrates into the skin of rats. *Sci World J.* 2014; 2014: 378024.
- Solà R, Valls RM, Martorelli I, et al. A low-fat yoghurt supplemented with a rooster comb extract on muscle joint function in adults with mild knee pain: a randomized, double blind, parallel, placebo-controlled, clinical trial of efficacy. *Food Funct.* 2015; 6(11): 3531-3539.
- Fraser JRE, Laurent TC, Engström-Laurent A, Laurent UGB. Elimination of hyaluronic acid from the bloodstream in the human. *Clin Exp Pharm Physiol.* 1984; 11: 17-25.
- Balogh L, Polyak A, Mathe D, et al. Absorption, uptake and tissue affinity of high-molecular-weight hyaluronan after oral administration in rats and dogs. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(22): 10582-10593.
- Kimura M, Maeshima T, Kubota T, et al. Adsorption of orally administered hyaluronan. *J Med Food.* 2016; 19: 1172-1179.
- Hisada N, Satsu H, Mori A, et al. Low-Molecular-Weight Hyaluronan Permeates through Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers via the Paracellular Pathway. *Biosci Biotech and Biochem.* 2008; 72(4): 1111-1114.
- Brown TJ, Alcorn D, Fraser JR. Absorption of hyaluronan applied to the surface of intact skin. *J Invest Dermatol.* 1999; 113(5): 740-746.
- Boelsma E, Gibbs S, Faller C, Ponc M. Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. *Acta Derm Venereol.* 2000; 80(2): 82-88.
- Ponc M, Boelsma E, Weerheim A, et al. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *Int J Pharm.* 2000; 203(1-2): 211-25.
- Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm.* 2001; 215(1-2): 51-56.
- Lotte C, Patouillet C, Zanini M, et al. Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2002; 15(1):18-30.
- Bernard FX, Pedretti N, Rosdy M, Deguercy A. Comparison of gene expression profiles in human keratinocyte mono-layer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis. *Exp Dermatol.* 2002; 11(1): 59-74.
- Ponc M, Boelsma E, Gibbs S, Mommaas M. Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2002; 15 (1): 4-17.
- OECD guideline for the testing of chemicals - Skin Absorption: in vitro method, OECD TG428. 2004.
- Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005; 60(2): 167-178.
- Schreiber S, Mahmoud A, Vuia A, et al. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. *Toxicol In Vitro.* 2005; 9(6): 813-822.
- Schäfer-Korting M, Bock U, Gamer A, et al. Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study. *Altern Lab Anim.* 2006; 34(3): 283-294.

36. Marsh JA, Hallett FR, Owen RR. A Comparison of Techniques for the Quantitative Analysis of Hyaluronic Acid in Equine Synovial Fluid. *Can. J. comp. Med.* 1976; 40: 202-208.
37. Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. The nitric oxide scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb761. *Bioche Biophys Res Comm.* 1994; 201: 748-755.
38. Puoci F, Iemma F, Curcio M, et al. Synthesis of Methacrylic-Ferulic acid Copolymer with antioxidant properties by single-step free radical polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 10646-10650.
39. Pitarresi G, Craparo EF, Palumbo FS, et al. Composite Nanoparticles Based on Hyaluronic Acid Chemically Cross-Linked with α,β -Polyaspartylhydrazide. *Biomacromolecules* 2007; 8: 1890-1898.
40. Schanté C, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. Synthesis of N-alanyl-hyaluronamide with high degree of substitution for enhanced resistance to hyaluronidase-mediated digestion. *Carbohydrate Polymers.* 2011; 86: 747-752.
41. D'Agostino A, Stellavato A, Busico T, et al. In vitro analysis of the effects on wound healing of high- and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid H-HA/L-HA complexes. *BMC Cell Biology.* 2015; 16: 19.
42. Kothapalli D, Flowers J, Xu T, et al. Differential activation of ERK and Rac mediates the proliferative and anti-proliferative effects of hyaluronan and CD44. *J Biol Chem.* 2008; 283(46): 31823-31829.
43. Schiraldi C, La Gatta A, De Rosa M. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers.* 2010.

Studio in aperto in condizioni di reale pratica clinica degli effetti di Aisuricin 1000 mg[®], nutraceutico combinato ad azione ipouricemizzante, in soggetti adulti affetti da iperuricemia asintomatica

Open real practice trial testing the effects of the urate-lowering combined nutraceutical Aisuricin 1000 mg[®] in subjects affected by asymptomatic hyperuricemia

Vincenzo Montemurro¹, Roberto Pescatori²

¹ Responsabile Ambulatorio di Cardiologia, Presidio "Scillesi d'America" - Scilla ASP Reggio Calabria

² Medico di Medicina Generale, Specialista Cardioangiologia, Consulente Casa di Cura Villa Montallegro Genova, Resp Regional Liguria Sicsport

Abstract

Background: Asymptomatic hyperuricemia is an emergent risk factor for cardiovascular and metabolic disorders whose incidence is strongly increasing in the next decades. The impact of life-style improvement on serum uricemia is relatively scarce while conventional drugs are only indicated for the treatment of more severe hyperuricemia and are frequently associated to not rare adverse events. In this context, a combined nutraceutical has been developed (Aisuricin 1000 mg[®]) whose components have demonstrated uric acid lowering effect in humans.

The aim of our real practice trial was to test the effect of Aisuricin 1000 mg[®] in subjects affected by moderate asymptomatic hyperuricemia.

Methods: Aisuricin 1000 mg[®] (containing Quercetin (200 mg), Prunus cerasus titrated at 5% of antocyanidine (300 mg) and Vitamine C (500 mg)) was administered once daily for one month to 40 consecutively enrolled adult subjects (both men and women) affected by asymptomatic hyperuricemia. The parameters monitored at both baseline and

at the end of the study were: body mass index, fasting plasma glucose and tolerability of the tested product.

Results: No enrolled subject experienced any adverse event during the tested product assumption. The mean levels of serum uric acid meanly improved from 7,7±0,9 mg/dL to 6,3±0,4 mg/dL (p<0,05 vs baseline). The mean observed reduction was similar in men and women.

Conclusion: In this preliminary open study, carried out in the setting of clinical practice, the tested combined nutraceutical Aisuricin 1000 mg[®] showed a significant serum uric acid lowering effect in subjects affected by asymptomatic hyperuricemia.

Abstract

Razionale: L'iperuricemia asintomatica è un fattore di rischio emergente per malattie cardiovascolari e metaboliche in netto incremento negli ultimi anni. L'impatto delle modificazioni dello stile di vita su questo parametro è relativamente scarso, mentre la terapia farmacologica è indicata solo per le forme di iperuricemia più severa e non

scevera di eventi avversi. In questo contesto è stato sviluppato un prodotto nutraceutico combinato (Aisuricin 1000 mg®) i cui componenti hanno dimostrato qualche attività ipouricemizzante nell'uomo. Lo scopo di questo studio condotto in condizioni di "real practice" ha inteso testare gli effetti di Aisuricin 1000 mg®, in soggetti affetti da moderata iperuricemia asintomatica.

Metodi: Aisuricin 1000 mg® (contenente Quercetina (200 mg), *Prunus cerasus* titolato al 5% di antocianidine (300 mg) e Vitamina C (500 mg)) è stato quindi somministrato alla dose di 1 bustina/die, per 1 mese a 40 soggetti adulti (uomini e donne) consecutivamente arruolati, affetti da iperuricemia asintomatica. I parametri monitorati alla baseline e a fine studio sono stati: indice di massa corporea, glicemia a digiuno, uricemia a digiuno, tollerabilità del prodotto testato.

Risultati: Nessun soggetto arruolato ha lamentato eventi avversi in corso di assunzione del prodotto testato a fronte di una riduzione media dei valori di uricemia da $7,7 \pm 0,9$ mg/dL a $6,3 \pm 0,4$ mg/dL ($p < 0,05$ vs basale). La riduzione di uricemia osservata è stata simile in uomini e donne.

Conclusione: in questo studio in aperto condotto in condizioni di pratica clinica il nutraceutico combinato Aisuricin 1000 mg® è risultato svolgere efficace azione ipouricemizzante in soggetti affetti da iperuricemia asintomatica.

Introduzione

Con il termine iperuricemia asintomatica si intende una condizione caratterizzata, in assenza di qualsiasi sintomo, da valori di acido urico nel sangue tali da indurre il rischio di deposizione di urati nelle articolazioni o nei tessuti: la soglia di valore ottimale è fissata a 7 mg/dl nell'uomo e 6,5 mg/dl nella donna, valori al di sopra dei quali è possibile la saturazione nel sangue dell'acido urico e quindi la sua precipitazione sotto forma di cristalli. Alcune indicazioni recenti di letteratura suggeriscono che i valori ottimali siano tuttavia notevolmente inferiori, almeno inferiori a 6 mg/dl (1).

In condizioni normali, la quantità totale di acido urico presente in forma diffusibile, a scambio rapido, nel plasma e nei liquidi interstiziali (il cosiddetto pool miscibile) è di circa 1000 mg, con oscillazioni che vanno dai 500 ai 1300 mg. Tale pool è mantenuto in equilibrio tra le "entrate" e le "uscite": le prime (input) sono rappresentate dall'immissione in circolo di acido urico proveniente in maggior parte dalla produzione endogena di purine (pari a 600-700 mg) e in minor misura dall'apporto esogeno alimentare (200 mg) e da quello conseguen-

te al catabolismo degli acidi nucleici tissutali (100 mg); le seconde (output) sono rappresentate in buona parte dall'escrezione urinaria (400-600 mg), in misura minore dall'eliminazione per via intestinale (100-200 mg) (2).

Considerato questo meccanismo di regolazione, un aumento dell'uricemia può riconoscere fondamentalmente due cause, vale a dire un aumento della sintesi o una ridotta eliminazione urinaria di acido urico. L'apporto alimentare invece non costituisce una causa importante di iperuricemia, in quanto il massimo incremento di acido urico ottenibile con una dieta ricca in purine, così come la massima riduzione dell'uricemia conseguente a una restrizione alimentare di purine, è di circa 1 mg/dl. Tale constatazione, unita al fatto che gli atomi che costituiscono l'anello purinico riconoscono un'origine molto semplice e varia (CO_2 , glicina, glutammina, acido aspartico ecc.), è tra l'altro il motivo della limitata utilità delle diete ipo-puriniche nel trattamento delle iperuricemie e della gotta (3).

L'iperuricemia è un fattore di rischio cardiovascolare indipendente, sempre più riconosciuto dalla comunità medico-scientifica. Dati recenti suggeriscono che l'iperuricemia sia anche fattore di rischio per lo sviluppo di insufficienza renale, diabete di tipo 2 e demenza. L'iperuricemia è considerata un fattore di rischio di mortalità soprattutto nelle donne, negli anziani e nei soggetti ad elevato rischio cardiovascolare o affetti da preesistenti malattie cardiovascolari (4).

La prevalenza dell'iperuricemia nei Paesi occidentali si attesta tra l'8-10% della popolazione adulta con picchi fino al 25-30% delle persone in sovrappeso o affetti da Sindrome Metabolica (5).

L'effetto della modificazione dello stile di vita sui livelli di uricemia è relativamente scarso: le indicazioni generali suggeriscono una dieta equilibrata, finalizzata al controllo del peso corporeo (modello mediterraneo o DASH) (6).

Alcune sostanze di origine naturale, particolarmente concentrate in alcuni alimenti e piante medicinali possono influenzare positivamente i livelli di uricemia. Tra queste sostanze naturali è nota la quercetina che appartiene a un gruppo di pigmenti vegetali chiamati flavonoidi, i quali esercitano attività antiossidante eliminando i radicali liberi che danneggiano le membrane cellulari. Precisamente, la quercetina è un flavonolo che esercita un effetto protettivo contro l'aterosclerosi interferendo con l'attività proaterogena dei macrofagi e la risposta pro-ossidante/pro-infiammatoria (7).

La quantità di quercetina assunta giornalmente con la dieta (25-30 mg) è molto lontana dal poter svolgere una qualsivoglia attività biologica. Anche dopo un pasto ricco di alimenti contenenti la molecola, dunque, le concentrazioni ematiche sarebbero troppo basse per giustificare l'attività che invece è associabile all'assunzione di dosi farmacologiche. La quercetina è inibitore di xantina ossidasi ed agisce pertanto inibendo la sintesi di acido urico a partire dalle purine (8). In modelli preclinici, la quercetina esercita chiare azioni antinfiammatorie, ipouricemizzanti e nefroprotettive (9).

In uno studio in doppio cieco, cross-over vs placebo, effettuato su 22 pazienti pre-iperuricemici, la quercetina è stata somministrata alla dose di 500 mg/die per 4 settimane. L'obiettivo primario dello studio era la riduzione dell'acido urico dopo 2 e 4 settimane rispettivamente. Il trattamento con quercetina ha ridotto le concentrazioni plasmatiche di acido urico mediamente di 26.5 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0.001$) (10,11),

Anche le ciliegie (*Prunus cerasus*) contengono importanti quantità di flavonoidi, in particolare antociani e catechine. In modelli preclinici il succo di ciliegia ha dimostrato di inibire l'attività della xantina ossidasi epatica e di svolgere attività antinfiammatoria (12). In uno studio preliminare condotto su 10 donne volontarie sane l'assunzione di 280 grammi di ciliegie è stato associato a riduzione significativa dell'uricemia del 14.5% rispetto al basale (13). Uno studio clinico ha valutato gli effetti della assunzione di ciliegie sulla funzione vascolare di soggetti affetti da ipertensione borderline (14).

In un altro studio in cieco randomizzato, sono stati somministrati a 12 volontari sani (età media 26 anni), 2 dosi di succo concentrato di ciliegie: circa 30 ml del succo concentrato miscelato con 100 ml di acqua (equivalente a 90 ciliegie intere) o 60 ml di succo concentrato mescolato con 100 ml di acqua. Tale studio ha evidenziato che il succo di ciliegia ha ridotto i livelli ematici di acido urico e di proteina C-reattiva (15). In uno studio caso-controllo condotto su 633 soggetti affetti da gotta il consumo di estratto di ciliegie ha determinato la riduzione del 35% del rischio di un nuovo attacco gottoso acuto, riduzione che arrivava al 75% quando il consumo di ciliegie veniva associato ad allopurinolo (16).

La vitamina C è il più potente antiossidante idrosolubile presente nel plasma sanguigno e agisce anche come rigeneratore di vitamina E e di specie cationiche radicaliche di carotenoidi. Le piante ed alcuni organismi animali sono in grado di sintetizzarla a partire dai glucidi, men-

tre l'uomo non è capace di sintetizzarla e deve introdurla con gli alimenti. È noto l'effetto sinergico delle vitamine E, C e del β -carotene come "scavengers" nei confronti di specie reattive dell'azoto. In uno studio in doppio cieco controllato con placebo la Vitamina C somministrata alla dose di 500 mg per due mesi in 184 pazienti affetti da iperuricemia ha determinato una significativa riduzione ($p < 0,0001$) dell'acido urico (17). In uno studio osservazionale della durata di 20 anni la Vitamina C ha ridotto il rischio di gotta in modo dose-dipendente. In tale studio osservazionale prospettico su 1317 pazienti iperuricemici, la Vitamina C ha confermato la riduzione significativa del rischio di insorgenza di gotta (18).

Inoltre, nello stesso studio, è stata valutata l'associazione tra il consumo di vitamina C e la concentrazione di acido urico nel sangue in più di 1300 uomini non ipertesi e con un indice di massa corporea (BMI) inferiore a 30. Un consumo maggiore di vitamina C si è rivelato associato in modo significativo a una minore concentrazione di acido urico, dopo aver tenuto conto di diversi fattori tra cui fumo, etnia, BMI, pressione sanguigna, presenza di gotta, assunzione di aspirina, introito calorico. Inoltre, in chi assumeva più vitamina C è stata evidenziata una minore prevalenza di iperuricemia.

Secondo gli autori della ricerca questi dati supporterebbero un potenziale ruolo della vitamina C nella prevenzione dell'iperuricemia e della gotta.

Lo scopo di questo studio condotto in condizioni di "real practice" ha inteso testare gli effetti di Aisuricin 1000 mg®, un nutraceutico combinato, in soggetti affetti da moderata iperuricemia asintomatica.

Materiali e metodi

Per questo studio sono stati consecutivamente arruolati 40 soggetti adulti sani (22 uomini e 18 donne) affetti da sola iperuricemia asintomatica.

Criteri di inclusione

- Uomini con acido urico sierico >7 mg/dL o donne con acido urico >6.5 mg/dl

Età compresa tra 28 e 67 anni

- BMI > 25 e <35 kg/m²

Criteri di esclusione

- Soggetti affetti da iperuricemia sintomatica
- Soggetti in prevenzione secondaria per patologia cardiovascolare o diabetici
- Soggetti in trattamento con farmaci potenzialmente influenzanti i valori di acido urico (in particolare diuretici tiazidici)

- Soggetti con insufficienza epatica o renale
- Soggetti in gravidanza o sospetta gravidanza
- Soggetti non in grado di comprendere le finalità dello studio

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un periodo di dieta di stabilizzazione di 4 settimane, finalizzata alla standardizzazione delle abitudini alimentari ed alla correzione delle abitudini più aberranti. Glicemia ed uricemia a digiuno da 12 ore sono state dosate con metodica standard da sangue periferico alla baseline e a fine studio. Le caratteristiche dei volontari alla baseline, dopo il periodo di stabilizzazione dietetica, sono riportate nella tabella 1.

Tutti i soggetti hanno quindi assunto Aisuricin® 1000 mg/die in bustine, contenenti Quercetina (200 mg), *Prunus cerasus* titolato al 5% in antocianidine (300 mg) e Vitamina C (500 mg), per un periodo di 4 settimane al termine del quale sono stati rivalutati per tutti i pazienti i parametri analizzati (T1).

I dati sono stati espressi come medie±deviazione standard. I parametri analizzati sono stati confrontati tramite t-test per campioni appaiati. La soglia di significatività è stata posta a $p < 0,05$.

Risultati

Nessun soggetto arruolato ha lamentato eventi avversi in corso di assunzione del prodotto testato. Dei 40 pazienti arruolati, 36 hanno concluso lo studio, rispettivamente 19 uomini e 17 donne: 4 pazienti (3 uomini e 1 donna) non si sono presentati al follow up dopo 4 settimane.

Il trattamento con Aisuricin® 1000 mg/die per un mese ha determinato una significativa riduzione dei valori di uricemia a digiuno (Figura 1). L'uricemia è passata da $7,7 \pm 0,9$

mg/dl a $6,3 \pm 0,4$ mg/dl nel campione complessivo ($p < 0,05$ vs basale). Nei soggetti di sesso maschile l'uricemia si è ridotta da $8,0 \pm 1,0$ mg/dl a $6,7 \pm 1,2$ ($p < 0,01$) mentre nelle femmine da $7,2 \pm 1,5$ mg/dl a $6,1 \pm 1,2$ mg/dl ($p < 0,05$), senza differenza significativa fra generi (Figura 1).

L'indice di massa corporea e la glicemia dei pazienti non si sono modificati in corso di assunzione di Aisuricin 1000 mg/die per un mese.

Discussione

Al momento non esiste terapia farmacologica indicata per il trattamento dell'iperuricemia asintomatica. La terapia di primo livello si basa su inibitori della xantina-ossidasi (allopurinolo, febuxostat), di per sé non dotati di un profilo di tollerabilità ottimale (per lo meno non tale da giustificare un ampio utilizzo per ridurre valori subottimali di uricemia) (19).

Allopurinolo è generalmente somministrato per 2-3 settimane dopo il trattamento per fase acuta di gotta e la somministrazione va protratta per un tempo indefinito, stabilito dal medico sulla base della gravità della malattia e sulla risposta del paziente. Si assumono inizialmente 100 mg al dì di farmaco, dopo il pasto; successivamente, la dose va adeguata sulla base dei livelli di concentrazione plasmatica di acido urico.

Per le forme lievi di gotta, la dose di mantenimento è 100-200 mg di farmaco al dì; questa aumenta fino a 300-600 mg/die nelle forme medie e a 700 mg/die per quelle gravi. In caso di insufficienza renale la posologia deve essere ridotta. Gli effetti collaterali dell'allopurinolo consistono in diarrea, senso di malessere generale, mal di stomaco (meno frequente se si assume

Caratteristiche del campione post- run-in ed all'inizio del periodo di trattamento attivo

	Totale n= 40		Uomini n=22		Donne n=18	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Età (anni)	48,9	10,5	50,9	10,2	46,2	10,6
BMI (Kg/m2)	30,4	3,1	30,6	2,7	30,1	3,2
Acido urico (mg/dl)	7,7	0,9	8,0	1,0	7,2	0,8
Glucosio (mg/dl) a digiuno	78,6	8,1	83,9	7,2	82,1	6,7

Tab. 1

Variazioni dell'uricemia nel campione studiato

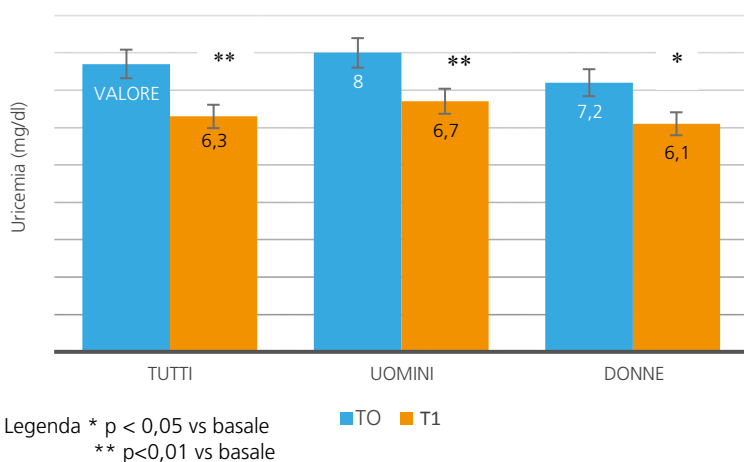


Fig. 1

a stomaco pieno); mal di testa, vertigini, sonnolenza; sapore metallico in bocca; formicolii o "addormentamento" delle mani o dei piedi; prurito, orticaria, formazione di scaglie, mal di gola o febbre inspiegabile, colorazione giallastra della pelle o degli occhi (20). Febuxostat è disponibile in compresse da 80 e 120 mg, è più efficace e meglio tollerabile di allopurinolo, ma anche molto più costoso. Gli effetti collaterali più frequenti di Febuxostat consistono in aumento delle transaminasi 3 volte superiore i limiti di normalità (3,5%), diarrea (2,7%), cefalea (1,8%), nausea (1,7%) e rash cutanei (1,5%). Negli studi di estensione in aperto tra gli effetti collaterali si è verificata anche l'ipertensione arteriosa. Inoltre, nei pazienti trattati con febuxostat si è osservata una maggiore incidenza di eventi cardiovascolari rispetto al gruppo trattato con allopurinolo sia negli studi registrativi (1,3 vs 0,3 eventi per 100 pazienti/anno) che in quelli di estensione a lungo termine (1,4% vs 0,7 eventi per 100 pazienti/anno); pertanto il Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto (RCP) sconsiglia febuxostat nei pazienti con cardiopatia ischemica o con scompenso cardiaco congestizio (21). Quindi, i farmaci ipouricemizzanti hanno un rapporto rischio-beneficio positivo in pazienti con livelli elevati di acido urico sierico, ma meno chiaro in soggetti con iperuricemia asintomatica border-line, tuttavia associa-

ta ad un aumento del rischio cardiometabolico (22).

In questo contesto si colloca il ruolo potenziale del nutraceutico combinato Aisuricin® 1000 mg, una formulazione originale a base di Quercetina (200 mg), *Prunus cerasus titolato* 5% di antocianidine (300 mg) e Vitamina C (500 mg). La Quercetina è il più potente inibitore di questo enzima della sua classe (Flavonoli) e possiede un'azione sovrapponibile a quella dell'Allopurinolo senza dividerne gli effetti indesiderati. Vitamina C e PC condividono anch'essi un'azione anti-uricemica che con quella della Quercetina contribuiscono all'attività sinergica verso questa diffusa alterazione metabolica (23)

L'importanza di Aisuricin® 1000 mg dal punto di vista farmacologico consiste nel fatto di garantire per tutti i suoi costituenti concentrazioni efficaci; infatti sia

per quanto riguarda la Quercetina il PS e la Vitamina C pur essendo presenti in molti cibi della dieta le quantità assunte non sono in grado di garantire una biodisponibilità congrua con l'azione da svolgere.

Ad esempio, nella dieta la quantità di Quercetina può arrivare al massimo a 30 mg mentre negli studi dosi comprese tra 100 e 500 mg hanno garantito una buona biodisponibilità ed una efficacia notevole sui parametri metabolici alterati. Da qui la necessità di utilizzare un integratore alimentare che è in grado di supplire alle carenze dietetiche di alimenti contenenti elementi che il nostro organismo deve assumere dall'esterno in quanto incapace di produrli. L'iperuricemia asintomatica è una condizione di frequente riscontro nella popolazione generale.

L'iperuricemia è considerata un fattore di rischio di mortalità soprattutto nelle donne, negli anziani e nei soggetti ad elevato rischio cardiovascolare o affetti da preesistenti malattie cardiovascolari.

Aisuricin® è inoltre risultato caratterizzato da una tollerabilità ottimale.

In conclusione, nei pazienti affetti da Iperuricemia asintomatica, Aisuricin® 1000 mg grazie al sinergismo d'azione dei suoi costituenti e alla elevata tollerabilità, rappresenta una valida alternativa alla terapia tradizionale.

BIBLIOGRAFIA

- Desideri G, Castaldo G, Lombardi A, Mussap M, Testa A, Pontremoli R, Punzi L, Borghi C. Is it time to revise the normal range of serum uric acid levels? *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(9):1295-306.
- Borghi C, Rosei EA, Bardin T, Dawson J, Dominiczak A, Kielstein JT, Manolis AJ, Perez-Ruiz F, Mancina G. Serum uric acid and the risk of cardiovascular and renal disease. *J Hypertens.* 2015 Sep;33(9):1729-41
- Grassi D, Desideri G, Di Giacomantonio AV, Di Giosia P, Ferri C. Hyperuricemia and cardiovascular risk. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2014 Dec;21(4):235-42.
- Grassi D, Desideri G, Ferri C. New Insight into Urate-Related Mechanism of Cardiovascular Damage. *Curr Pharm Des.* 2014;20(39):6089-95.
- Wang H, Zhang H, Sun L, Guo W. Roles of hyperuricemia in metabolic syndrome and cardiac-kidney-vascular system diseases. *Am J Transl Res.* 2018 Sep 15;10(9):2749-2763.
- Beyl RN Jr, Hughes L, Morgan S. Update on Importance of Diet in Gout. *Am J Med.* 2016 Nov;129(11):1153-1158.
- Dabeek WM, Marra MV. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. *Nutrients.* 2019 Sep 25;11(10). pii: E2288.
- Mohos V, Pánovics A, Fliszár-Nyúl E, Schilli G, Hetényi C, Mladěnka P, Needs PW, Kroon PA, Pethő G, Poór M. Inhibitory Effects of Quercetin and Its Human and Microbial Metabolites on Xanthine Oxidase Enzyme. *Int J Mol Sci.* 2019 May 31;20(11). pii: E2681.
- Huang J, Zhu M, Tao Y, Wang S, Chen J, Sun W, Li S. Therapeutic properties of quercetin on monosodium urate crystal-induced inflammation in rat. *J Pharm Pharmacol.* 2012 Aug;64(8):1119-27.
- Shi Y, Williamson G. Quercetin lowers plasma uric acid in pre-hyperuricaemic males: a randomised, double-blinded, placebo-controlled, cross-over trial. *Br J Nutr.* 2016 Mar 14;115(5):800-6.
- Gomes IB, Porto ML, Santos MC, Campagnaro BP, Gava AL, Meyrelles SS, Pereira TM, Vasquez EC. The protective effects of oral low-dose quercetin on diabetic nephropathy in hypercholesterolemic mice. *Front Physiol.* 2015 Sep 2;6:247.
- Haidari F Jr, Mohammad Shahi M, Keshavarz SA, Rashidi MR. Inhibitory Effects of Tart Cherry (*Prunus cerasus*) Juice on Xanthine Oxidoreductase Activity and its Hypouricemic and Antioxidant Effects on Rats. *Malays J Nutr.* 2009 Mar;15(1):53-64.
- Jacob RA, Spinuzzi GM, Simon VA, Kelley DS, Prior RL, Hess-Pierce B, Kader AA. Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women. *J Nutr.* 2003 Jun;133(6):1826-9.
- Keane KM, George TW, Constantinou CL, Brown MA, Clifford T, Howatson G. Effects of Montmorency tart cherry (*Prunus Cerasus* L.) consumption on vascular function in men with early hypertension. *Am J Clin Nutr.* 2016 Jun;103(6):1531-9.
- Bell PG, McHugh MP, Stevenson E, Howatson G. The role of cherries in exercise and health. *Scand J Med Sci Sports.* 2014 Jun;24(3):477-90.
- Zhang Y, Neogi T, Chen C, Chaisson C, Hunter DJ, Choi HK. Cherry consumption and decreased risk of recurrent gout attacks. *Arthritis Rheum.* 2012 Dec;64(12):4004-11.
- Huang HY, Appel LJ, Choi MJ, Gelber AC, Charleston J, Norkus EP, Miller ER. The Effects of Vitamin C Supplementation on Serum of Uric Acid: Results of a Randomized Controlled Trial. *Arthritis Rheum.* 2005;52(6):1843-1847.
- Choi HK, Gao X, Curhan G. Vitamin C Intake and the Risk of Gout in Men A Prospective Study *Arch Intern Med.* 2009;169(5):502-507
- Bove M, Cicero AF, Veronesi M, Borghi C. An evidence-based review on urate lowering treatments: Implications for optimal treatment of chronic hyperuricaemia. *Vasc Health Risk Manag.* 2016;13:23-28.
- Okafor ON, Farrington K, Gorog DA. Allopurinol as a therapeutic option in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 2017 Apr;172:139-150.
- Robinson PC, Dalbeth N. Febuxostat for the treatment of hyperuricaemia in gout. *Expert Opin Pharmacother.* 2018 Aug;19(11):1289-1299.
- Borghi C, Perez-Ruiz F. Urate lowering therapies in the treatment of gout: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 Mar;20(5):983-92
- Bak I, Lekli I, Juhasz B, Nagy N, Varga E, Varadi J, Gesztelyi R, Szabo G, Szendrei L, Bacskay I, Vecsernyes M, Antal M, Fesus L, Boucher F, de Leiris J, Tosaki A. Cardioprotective mechanisms of *Prunus cerasus* (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Sep;291(3):H1329-36.

Serenoa Repens e Urtica: caratterizzazione fito-chimica, metodi di estrazione e requisiti formulativi

Andrea Fratter

Pharm. D, Perfezionato in Farmacologia clinica

Esperto di tecnologie formulative in Nutraceutica, Presidente SIFNut.

La *Serenoa repens* (SR) è una palma con fusto appartenente alla famiglia delle *Aricaceae* che cresce endemica nel Sud-Est degli Stati Uniti, soprattutto in Florida e Arkansas. Le denominazioni comuni sono "*Palma Seghettata*" in Italia e "*Saw Palmetto*" negli Stati Uniti.

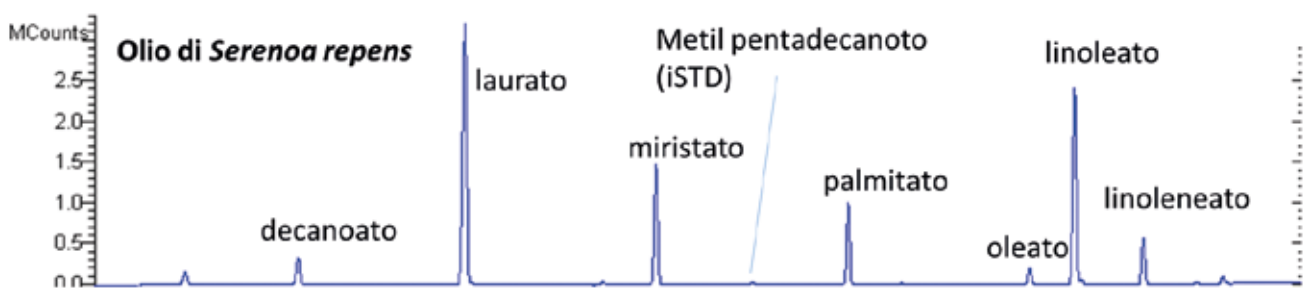
I principi attivi, per i quali la SR è conosciuta e impiegata in pratica clinica, sono riconducibili alle classi degli acidi grassi e dei fitosteroli. Il fitocomplesso, estratto dalle bacche della pianta, viene impiegato sotto forma di olio con un titolo in acidi grassi variabile tra l'80 e il 95% in peso e in fitosteroli da un minimo dello 0,2 a un massimo dello 0,8%. Tra i costituenti attivi principali del fitocomplesso sono di particolare rilevanza gli acidi grassi caprico, caprilico, laurico, oleico, miristolico, palmitico che si possono rilevare con analisi in Gas Cromatografia-Spettrometria di

Massa (GC-MS) (Fig. 1) e fitosteroli quali β -sitosterolo, β -sitosterolo-3-O-glucoside, campestrolo, stigmasterolo oltre a una frazione minoritaria composta di alcoli poliprenolici e flavonodi.

L'azione farmacologica della SR, mediata dal fitocomplesso sopra descritto, si estrinseca principalmente grazie ad un meccanismo di inibizione dell'enzima 5- α -riduttasi tipo I e II ubicato sui recettori degli androgeni espressi prevalentemente nel tessuto gonado-prostatico, ghiandole sebacee, follicolo pilifero (1,2).

In ragione di tale meccanismo d'azione la SR trova impiego principalmente in ambito urologico nel trattamento sintomatico della iperplasia prostatica benigna (IPB) androgeno-dipendente (3), sotto forma di integratori e farmaci, nella calvizie androgenetica (4) e nel trattamento dell'i-

Gas Cromatografia-Spettrometria di Massa



Tracciato gas-cromatografico (spettrometria di massa) di estratto oleoso di *Serenoa Repens* che mette in evidenza i principali acidi grassi che lo compongono.

Fig. 1

modificato da 24

per-seborrea sotto forma di lozioni idro-alcoliche e forme topiche emulsionate.

L'*Urtica dioica* e l'*Urtica Urens* sono piante erbacee, rispettivamente perenne e annuale, appartenenti alla famiglia delle *Urticaceae* che crescono in [Europa](#), [Asia](#), [Nord Africa](#) e [Nord America](#), alte tra i 30 e 200 cm comunemente note come ortica. Vengono impiegate in fitoterapia per il trattamento di disturbi minori dell'apparato urinario e le parti contenenti il fitocomplesso, costituito da flavonoidi, acido silicico, sali minerali (in particolare sali di calcio e potassio), Oli essenziali, oligoelementi, vitamine, carotenoidi sono le foglie e per quanto riguarda fitosteroli (beta-sitosterolo), lecitine, polisaccaridi, lignani, Idrossicumarine e ceramidi, la radice.

Gli estratti secchi di ortica sia *dioica* che *urens*, generalmente ottenuti per estrazione idroalcolica della radice, trovano principalmente impiego per la riduzione dei sintomi dell'IPB attraverso un meccanismo di riduzione della proliferazione cellulare (5) e per migliorare la sintomatologia e l'efficacia della terapia antibiotica in corso di prostatite batterica (6,7). Il dosaggio consigliato va dai 50 ai 200 mg per unità di somministrazione e le associazioni con *Serenoa Repens* risultano particolarmente efficaci nel trattamento di IPB e sintomi delle basse vie urinarie (BVU) con un titolo in fitosteroli espresso come b-sitosterolo dello 0,4% in peso.

Metodi di estrazione della *Serenoa Repens*

Il principale e più efficace metodo di estrazione del fitocomplesso attivo della SR utilizzato nell'industria farmaceutica e nutraceutica è l'estrazione supercritica in corrente di gas, una tecnica di estrazione molto diffusa ed efficiente che consente l'estrazione di determinate classi di principi attivi trattando la droga di partenza ad alta pressione in corrente di un gas, principalmente la CO₂. Il termine supercritica si riferisce ad una caratteristica fisica di alcuni gas che, in opportune condizioni di temperatura e pressione (temperatura e pressione superiori a quelle critiche del cambio di stato), cambiano il proprio stato di aggregazione, passando da gas a un fluido che riproduce tutte le caratteristiche di un liquido di estrazione, con la densità di un liquido e un valore pressoché nullo di tensione superficiale. Per queste caratteristiche i fluidi supercritici, di cui la CO₂ rappresenta il principale esponente per le applicazioni industriali, sono eccellenti solventi in grado di estrarre le frazioni apolari del fitocomplesso di droghe botaniche o marine (acidi grassi della serie ω3, ω6, vitamine liposolubili, cannabinoidi, flavonoidi, steroli, tocoferoli) (8,9,10). Oltre all'elevatissima

resa di estrazione che rende tale metodica estremamente efficace per i processi industriali di estrazione nell'industria alimentare, nutraceutica, cosmetica e farmaceutica, tale metodica consente altresì un'elevata purezza dell'estratto, dal momento che il fluido supercritico non è in grado di estrarre componenti polari e la totale assenza di solventi residui, a differenza delle comuni estrazioni con solventi organici (etanolo, isopropanolo, toluene e altri).

La CO₂ assume i connotati chimico-fisici di solvente quando passa dallo stato gassoso a bassa densità ad uno stato chiamato appunto 'supercritico' con densità più elevata: tale stato viene raggiunto quando la CO₂ viene portata simultaneamente alla temperatura di 32°C e alla pressione di 72 atm.

L'estrazione con fluidi supercritici è da considerarsi a tutti gli effetti un processo di *Green Technology* che garantisce sostenibilità ambientale e un alto grado di qualità e purezza del prodotto estratto. Un altro processo che si sta diffondendo nell'industria green dell'estrazione presuppone l'impiego di liquidi e solventi eutettici, NADES e IL, acronimi rispettivamente di *Natural Deep Eutectic Solvents* e *Ionic Liquids* (11,12). Tali solventi sono ottenuti dalla condensazione di particolari aminoacidi e sostanze azotate come la Glicina, la Prolina, la Carnitina con zuccheri come il Glucosio, Fruttosio e Sorbitolo e acidi organici come l'Acido Citrico, Malico e Maleico in presenza di un contenuto di acqua ridotto (<30%) e opportune condizioni di riscaldamento.

La SR è una pianta che si presta particolarmente all'estrazione con CO₂ supercritica dal momento che i componenti attivi del suo fitocomplesso, più sopra descritti, possiedono le caratteristiche peculiari di apolarità e natura oleosa tali da poter essere selettivamente estratti dalla corrente del gas supercritico fluidificato. Con questo processo, ormai considerato *gold standard* per gli estratti di SR, si può ottenere un elevato titolo in acidi grassi che può raggiungere, quando non superare, il 90% in peso dell'olio finale.

Biodisponibilità della SR e tecnologie a supporto

Il costante aumento negli ultimi anni dell'impiego e prescrizione dei nutraceutici a fini salutistici, quando non a supporto alle terapie mediche, ha portato allo sviluppo di nuove tecnologie formulative per aumentare la bioaccessibilità enterica e, in ultima analisi, la biodisponibilità di sostanze di natura vegetale, dotate di scarsa idrosolubilità nei liquidi enterici. Tali strategie prevedono l'incapsulazione dei principi attivi all'interno di micelle idrofile, di nano-emulsioni O/A, di sistemi auto-emulsionanti (SEDDS) o di

micronizzati e ultra-micronizzati (PEA, flavonoidi) (13-17). Nello specifico riferimento alla SR, la frazione lipido-sterolica che caratterizza il fitocomplesso attivo nel trattamento dell'IPB e che può raggiungere oltre il 90% in peso dell'estratto di SR, ha caratteristiche di estrema lipofilia e idrofobicità oltre a presentarsi sotto forma di olio. Tali caratteristiche rendono l'olio di SR molto poco dispersibile nei liquidi enterici che sono principalmente costituiti di acqua, sali, enzimi e, solo nella prima parte dell'intestino tenue (digiuno-ileo), arricchiti di sali biliari con azione emulsionante. Per queste ragioni la corretta strategia di formulazione dell'estratto di SR rappresenta un momento fondamentale di differenziazione dei diversi prodotti sul mercato (18).

In questo contesto appare particolarmente importante richiamare alcuni semplici concetti della fisiologia gastroenterica, al fine di comprendere la migliore strategia tecnologico-formulativa per migliorare la bioaccessibilità della SR. I grassi alimentari sono parzialmente idrolizzati ad opera

degli enzimi lipasici, espressi già nel cavo orale (saliva) (19) dove inizia il processo di *cleaving* dei trigliceridi in essi contenuti che prevede il distacco un acido grasso creando di fatto un diacilglicerolo.

Un simile meccanismo si mette in atto nello stomaco ove la lipasi gastrica idrolizza fino al 30% dei trigliceridi alimentari (20) (Fig. 2). Il processo continua nell'intestino tenue ove la lipasi pancreatico e la colipasi enterica attivata dai sali biliari completano il processo di idrolisi dando vita a monogliceridi degli acidi grassi e acidi grassi liberi che coadiuvano l'azione emulsionante e disperdente dei sali biliari che, nel range di pH tra 6,8-7,2, danno vita alle così dette micelle miste capaci di aumentare la superficie di contatto delle sostanze lipofile come acidi grassi, vitamine liposolubili, terpeni e fitosteroli con gli enterociti (21). Tale meccanismo consente a molte sostanze di impiego nutraceutico quali la SR, il CoQ10, il Resveratrolo, la Curcumina, la Vitamina D3, la Quercetina e molte altre di essere meglio assimilate dall'intestino in presenza di cibo e, in partico-

Rappresentazione dell'idrolisi di un trigliceride da parte della lipasi

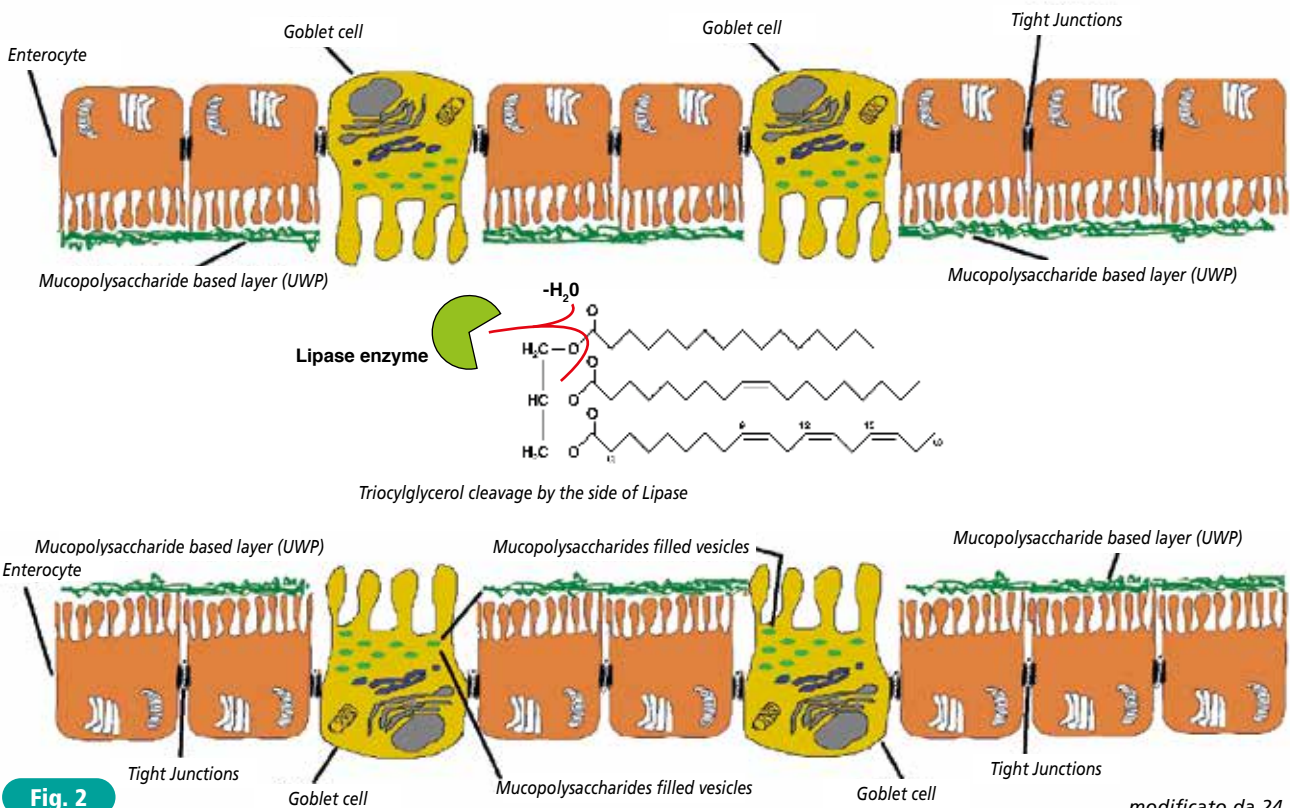


Fig. 2

modificato da 24

lare, di modiche quantità di grassi alimentari (22,23) o di tecnologie in grado di mimarne il meccanismo d'azione (24) (Fig. 3). In ragione delle sopra menzionate argomentazioni, da un punto di vista tecnologico, l'introduzione di modiche quantità di mono e digliceridi degli acidi grassi (E471), sostanze di comune impiego nell'industria alimentare e di emulsionanti naturali quali la Lecitina da girasole (E322), può contribuire in maniera sostanziale al miglioramento della bioaccessibilità enterica della SR e per conseguenza della sua biodisponibilità in seguito ad assunzione orale (Fig. 4). La forma farmaceutica prevalente, per non dire obbligata, vista la natura oleosa dell'estratto di SR è rappresentata dalla capsula soft gel contenente l'olio. La presenza degli eccipienti sopra ricordati, anche in modiche quantità (alcuni milligrammi), perfettamente compatibili con la natura oleosa dell'estratto, devono essere considerati un importante requisito tecnologico per il miglior assorbimento enterico della SR.

Per riassumere, i connotati di una buona formulazione di SR dovrebbero essere:

Forma farmaceutica: capsula di gelatina molle "softgel"

Dosaggio per capsula: 320 mg di estratto oleoso

Titolo dell'estratto: >85% in acidi grassi totali

Solvente di estrazione: CO₂ supercritica

Comparazione del comportamento di dispersione in SIF tra SR olio non formulato e SR veicolato con tecnologia LibADS



Comparazione tra un estratto oleoso di SR tit. 90% in acidi grassi (320 mg) disperso in un liquido enterico simulato (FaSSIF V2) tal quale (sx) e il medesimo estratto (320 mg) veicolato in presenza di mono e digliceridi degli acidi grassi e lecitina da girasole (dx). Appare evidente la migliore dispersione dell'olio di SR in presenza degli agenti emulsionanti, espressione di una migliore bioaccessibilità enterica

Fig. 4

modificato da 24

Eccipienti: mono e digliceridi degli acidi grassi (E471), Lecitina da girasole (E322)

Rappresentazione della formazione di micelle idrodispersibili di fitosteroli e acidi grassi liberi (Serenoa Repens) con mono e digliceridi e lecitina in presenza dei sali biliari

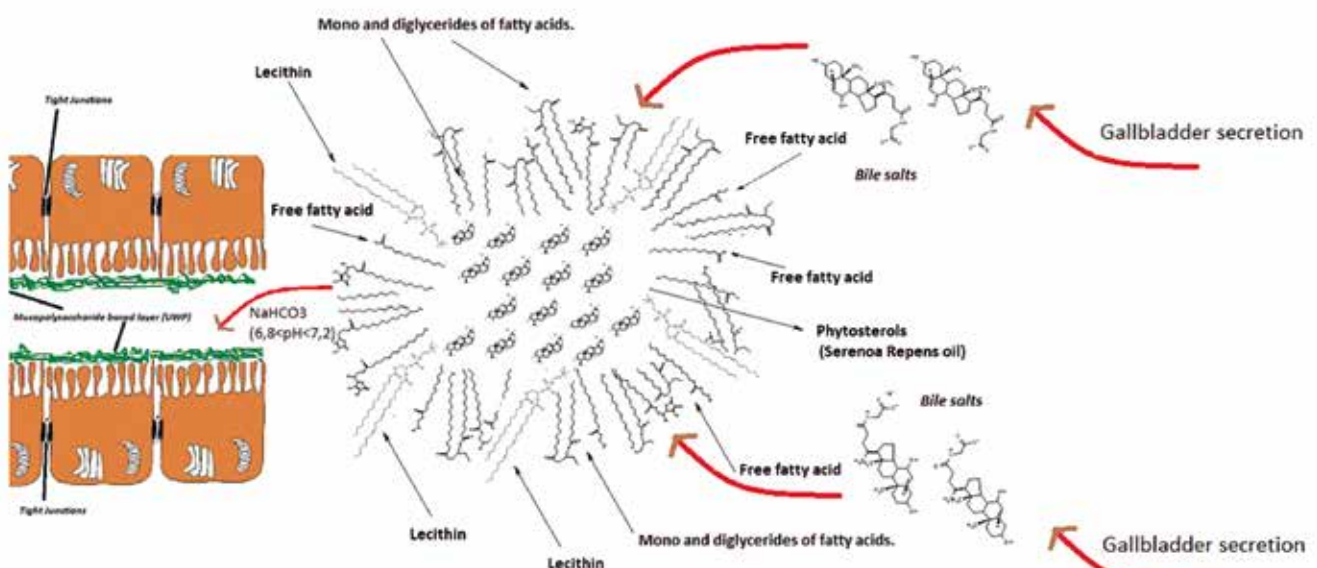


Fig. 3

modificato da 24

BIBLIOGRAFIA

- Buonocore D et al. Serenoa repens extracts: In vitro study of the 5 α -reductase activity in a co-culture model for Benign Prostatic Hyperplasia. *Arch Ital Urol Androl.* 2018 Sep 30;90(3):199-202.
- Bartsch G et al. Dihydrotestosterone and the concept of 5 α -reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *World J Urol.* 2002 Apr;19(6):413-25.
- Cicero AFG et al. Nutraceutical treatment and prevention of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Arch Ital Urol Androl.* 2019 Oct 2;91(3).
- Wessagowit V et al. Treatment of male androgenetic alopecia with topical products containing Serenoa repens extract. *Australas J Dermatol.* 2016 Aug;57(3):e76-82.
- Dhouibi R et al. Screening of pharmacological uses of Urtica dioica and others benefits. *Prog Biophys Mol Biol.* 2019 Jun 1. pii: S0079-6107(19)30098-7
- Cai T et al. Serenoa repens associated with Urtica dioica (ProstaMEV) and curcumin and quercetin (FlogMEV) extracts are able to improve the efficacy of prulifloxacin in bacterial prostatitis patients: results from a prospective randomised study. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Jun;33(6):549-53.
- Pigat N et al. Combined Sabal and Urtica Extracts (WS® 1541) Exert Anti-proliferative and Anti-inflammatory Effects in a Mouse Model of Benign Prostate Hyperplasia. *Front Pharmacol.* 2019 Mar 29;10:311.
- Longo C, Leo L, Leone A. Carotenoids, fatty acid composition and heat stability of supercritical carbon dioxide-extracted oleoresins. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4233-54.
- Leone A et al. Supercritical CO₂-extracted tomato Oleoresins enhance gap junction intercellular communications and recover from mercury chloride inhibition in keratinocytes. *J Agric Food Chem.* 2010 Apr 28;58(8):4769-78.
- Molino A et al. Eicosapentaenoic Acid Extraction from *Nannochloropsis gaditana* using Carbon Dioxide at Supercritical Conditions. *Mar Drugs.* 2019 Feb 22;17(2).
- Mišan A et al. The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019 Aug 13:1-29.
- Liu Y et al. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod.* 2018 Mar 23;81(3):679-690.
- Leonard TW, Lynch J, McKenna MJ, Brayden DJ. Promoting absorption of drugs in humans using medium-chain fatty acid-based solid dosage forms: GIPET. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006 Sep;3(5):685-92.
- MC Satia et al. A randomized two-way cross over study for comparison of absorption of vitamin D₃ buccal spray and soft gelatin capsule formulation in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption. *Nutr J.* 2015; 14: 114;
- Fratte A et al. Sublingual Delivery of Astaxanthin through a Novel Ascorbyl Palmitate-Based Nanoemulsion: Preliminary Data. *Mar Drugs.* 2019 Aug 29;17(9).
- Köhler A et al. Bioavailability of fatty acids from krill oil, krill meal and fish oil in healthy subjects--a randomized, single-dose, cross-over trial. *Lipids Health Dis.* 2015 Mar 15;14:19.
- Petosino S et al. Oral Ultramicroemulsified Palmitoylethanolamide: Plasma and Tissue Levels and Spinal Anti-hyperalgesic Effect. *Front Pharmacol.* 2018 Mar 20;9:249.
- Habib FK, Wyllie MG. Not all brands are created equal: a comparison of selected components of different brands of Serenoa repens extract. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2004;7(3):195-200.
- Patton JS et al. Hydrolysis of triacylglycerol emulsions by lingual lipase. A microscopic study. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Aug 18; 712(2):400-7.
- Rogalska E et al. Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *J Biol Chem.* 1990 Nov 25; 265(33):20271-6.
- Sams L et al. Relevant pH and lipase for in vitro models of gastric digestion. *Food Funct.* 2016 Jan; 7(1):30-45.
- López-Lluch G et al. Bioavailability of coenzyme Q10 supplements depends on carrier lipids and solubilization. *Nutrition.* 2019 Jan;57:133-140.
- Rich GT et al. Towards an Understanding of the Low Bioavailability of Quercetin: A Study of Its Interaction with Intestinal Lipids. *Nutrients.* 2017 Feb 5;9(2).
- Fratte A et al. Lipomatrix: A Novel Ascorbyl Palmitate-Based Lipid Matrix to Enhancing Enteric Absorption of Serenoa Repens Oil. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 4;20(3)