



UNICUSANO

Università degli Studi Niccolò Cusano - Telematica Roma

Master in

“FITOTERAPIA APPLICATA-Liv.2”

BIODISPONIBILITÀ DEI COMPOSTI FENOLICI: RESVERATROLO, CURCUMINA, CATECHINE E SILIMARINA

Candidato

FRANCESCA DI MASSIMO

Relatore

Prof. CLAUDIO BIAGI

ANNO ACCADEMICO 2019/2020

INDICE

Introduzione: <i>Definizione e motivazione della scarsa biodisponibilità dei principi attivi fitoterapici</i>	3
Obiettivi	6
Capitolo 1: <i>Proprietà dei polifenoli</i>	8
Capitolo 2: <i>Analisi specifica della biodisponibilità dei polifenoli</i>	13
Capitolo 3: <i>Tecniche migliorative della biodisponibilità dei principi attivi trattati</i>	22
<i>I fitosomi</i>	25
<i>Sostanze bioenhancer erballi</i>	31
<i>Sinergie ottenute attraverso la combinazione di erballi</i>	36
Capitolo 4: <i>Analisi critica della biodisponibilità dei polifenoli contenuti in due formule composte di estratti secchi titolati in termini di efficacia della formulazione</i>	43
Conclusione	46
Bibliografia	47

Introduzione: Definizione e motivazione della scarsa biodisponibilità dei principi attivi fitoterapici

Secondo l'Enciclopedia Treccani la biodisponibilità, in farmacologia e in fisiologia della nutrizione, è la quota di un farmaco, o di un fattore nutritivo introdotto nell'organismo, che viene effettivamente utilizzata.

‘Come per i farmaci, anche la formulazione di un fitoterapico deve sempre tener conto dei dati di farmacocinetica e di farmacodinamica disponibili sul derivato estrattivo che si intende utilizzare. Un parametro che accomuna enormemente gran parte, se non tutti, i principi attivi di origine fitoterapica è la loro scarsa biodisponibilità orale. *L'azione farmacologica di un composto è direttamente proporzionale alla quota percentuale capace di raggiungere la circolazione plasmatica.* Sostanze facilmente reperibili in piante alimentari come la curcumina, gli antociani o il resveratrolo, o sostanze reperibili in piante medicinali come la berberina, sono tutte assorbite per valori inferiori all'1% (valore calcolato rispetto alla quota reperibile nel plasma dopo iniezione endovenosa). La ragione di un dato cinetico così deludente ha molte spiegazioni, tra le quali incidono maggiormente:

- la possibile instabilità chimica in succo gastrico e/o enterico;
- il metabolismo degradativo a cui le sostanze fitoterapiche vengono sottoposte per azione della flora intestinale;
- l'eliminazione dei composti fitoterapici che avviene nel fegato ad opera dei citocromi che corrispondono a due categorie di enzimi (detti di Fase I e di Fase II). Gli enzimi di Fase I sono di ossido-reduttasi la cui finalità è *demolire* quei composti, che hanno raggiunto ad esempio il fegato tramite circuito portale direttamente dall'intestino, inattivandoli. La demolizione ossido-reduttiva produce, però, metaboliti probabilmente più lipofili di quanto non lo fossero prima e quindi potenzialmente riassorbibili dall'emuntorio renale. Entrano allora in gioco gli enzimi di Fase II che coniugando il metabolita, frutto dell'azione dell'ossido-reduttasi di Fase I, con un composto altamente idrofilo, ad esempio l'acido glucuronico, ne facilitano l'eliminazione urinaria;
- la barriera intestinale: nell'intestino sono presenti altri sistemi di *detossificazione* che contribuiscono a ridurre enormemente la biodisponibilità orale dei fitoterapici. Tali sistemi sono rappresentati dal gruppo delle ATP-Binding Cassette (dette anche proteine ABC), un

sistema di proteine ATP-consumanti la cui azione è estrarre composti, permeati per lipofilia all'interno dell'enterocita nel lume intestinale, limitandone la possibilità di raggiungere il circuito portale e da qui il tessuto epatico. La pompa estrudente più studiata, oggetto anche d'indagine oncologica, è la glicoproteina-P¹.

Secondo la teoria evolutiva, i citocromi sono il risultato dell'evoluzione e del rapporto tra la pianta e l'uomo: quest'ultimo infatti, nel tempo, ha codificato enzimi detossicanti che gli potessero permettere di liberarsi dai metaboliti secondari prodotti dalle piante in quanto essi non hanno alcun valore nutrizionale per l'uomo; il motivo della loro sintesi da parte della cellula vegetale è essenzialmente la *difesa*. Tali metaboliti hanno però un interesse farmacologico e per questo sono anche definiti i principi attivi fitoterapici. 'Questo spiega sicuramente la particolare inefficienza farmacologica di gran parte degli integratori fitoterapici. Vengono infatti concentrati e somministrati ad individui che, sulla base dello stampo molecolare costituito da queste stesse sostanze naturali presenti negli alimenti, hanno costruito enzimi disattivanti (ossido-reduttasi) o coniuganti favorevoli l'eliminazione (glucuronidasi). L'interazione col cibo ha permesso l'evoluzione di quegli stampi molecolari che oggi limitano moltissimo l'assorbimento dei composti fitoterapici, molto spesso ancora oggi estratti da matrici alimentari; allo stesso tempo ha consentito molto meno che questo processo avvenisse per quelle sostanze tossiche che maggiormente si concentrano in derivati botanici non commestibili e che quindi, attraverso il processo evolutivo, i mammiferi hanno imparato ad evitare di ingerire. Questa considerazione spiegherebbe tra l'altro la grande efficienza farmacologica di quei composti, sempre di derivazione vegetale, ad elevato profilo di tossicità ed impiegati validamente ancora oggi, ad esempio nel settore oncologico (derivati della *vinca*, del *tasso*, della *camptoteca*) o in altri settori (derivati della *digitale*, del *colchico*, della *belladonna*), solo per fare alcuni tra gli esempi più noti. Certamente questo processo evolutivo che ha portato l'uomo ad una sorta di detossificazione molecolare e che oggi contribuisce a spiegare parte dell'inefficienza e della scarsa biodisponibilità orale dai fitoterapici, come anche di parte delle sue interazioni con i farmaci di sintesi, non si risolve considerando i soli aspetti di

1 Il presente capitolo è liberamente tratto dal testo Di Pierro F., Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica (Italian Edition), CEC Editore, Gennaio 2014.

protezione epatica. E questo non soltanto perché i citocromi sono ben presenti anche nell'intestino, ma perché l'intestino stesso costituisce un'altra vera ed efficiente barriera.

Si prenda ad esempio il caso della *berberina*. Fino al 90% della quota somministrata per bocca viene ri-estrusa, e quindi non più assorbita nel lume intestinale per opera della glicoproteina-P. La presenza dei sistemi ABC intestinali non spiega solo il basso profilo di assorbimento di alcuni fitoterapici e nemmeno solo i fenomeni di competizione possibile tra farmaci di sintesi e fitoterapici. Tale presenza, non va escluso, genera senza dubbio anche fenomeni di competizione tra erballi diversi o tra molecole diverse dello stesso erbale. Questo spiegherebbe le differenze, in termini cinetici, che si osservano al procedere della purificazione di un principio attivo erbale a partire da una matrice vegetale estratta, ma comunque meno purificata. Si prenda l'esempio del *cardo mariano*. Il suo estratto, noto come *silimarina*, corrisponde ad una miscela di flavanolignani quasi interamente rappresentati dalla *silibina*, dalla *silidianina* e dalla *silicristina*. Curiosamente, a parità di dosaggio somministrato, la biodisponibilità della silibina è molto minore, quasi nulla, se si somministra silibina pura rispetto ad una somministrazione del medesimo quantitativo di silibina all'interno della matrice silimarina. Questo fenomeno, generalizzabile alla maggior parte delle preparazioni fitoterapiche, potrebbe in qualche modo essere ricondotto anche alla presenza dei sistemi ABC intestinali e alla loro maggiore o minore efficienza estrudente in relazione alla presenza di altri composti. Una prova diretta di quanto sostenuto la si ottiene verificando l'efficienza clinica di una preparazione contenente solo berberina o berberina e silimarina insieme. Entrambe le sostanze interagiscono con la glicoproteina-P e le prestazioni della berberina sono negativamente influenzate dall'estrusione intestinale mediata dalla glicoproteina-P. Antagonisti della glicoproteina-P sia di sintesi che naturali, come la silimarina appunto, migliorano la biodisponibilità e l'efficienza clinica della berberina.

Una breve menzione deve invece essere fatta relativamente al ruolo che ha lo *stomaco*, o potrebbe avere, nell'influenzare l'efficienza farmaco-clinica dei derivati estrattivi. Le molecole estratte dalla pianta si trovavano nell'interno di un citoplasma vegetale con un pH vicino alla neutralità: dopo la somministrazione orale, la stessa molecola verrà a trovarsi nello stomaco di un soggetto il cui pH risulterà essere molto basso, vicino a valori di 1.0-1.5.; la maggior parte dei derivati estrattivi tendono ad essere gestibili in ambiente acido e soffrono spesso maggiormente l'ambiente alcalino. Però non è sempre vero; un'eccezione potrebbe essere rappresentata dalle proteine: non molto

comuni tra gli attivi di origine vegetale, fanno comunque parte dell'armamentario fitoterapico. Esempio è la *bromelina* da *ananas comosus*, una proteina con azione anti-enzimatica, o direttamente enzimatica, che necessita di una certa protezione "conformazionale" che ne preservi l'integrità funzionale. Il basso pH dello stomaco è certamente non favorevole al mantenimento di tale integrità funzionale'.²

Obiettivi

Questa ricerca ha lo scopo di valutare gli aspetti della biodisponibilità di alcuni composti fenolici, in particolare:

- il resveratrolo
- la curcumina
- la silimarina
- le catechine

È largamente dimostrato³ che tutta la classe dei polifenoli (fig. 0.1) ha proprietà terapeutiche anche a livelli di intake alimentare. Pertanto, in questo lavoro, riporto gli studi che dimostrano gli effetti, anche epigenetici, che si possono raggiungere con un aumento della biodisponibilità dei polifenoli assunti come principi attivi fitoterapici.

Penso che la questione della biodisponibilità sia di particolare interesse per i composti selezionati che hanno dimostrato di avere proprietà di modulazione epigenetica, in quanto gli effetti positivi sulla salute possono aumentare esponenzialmente.

² c.s.

³ AAVV, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability", in Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, Febbraio 2007.

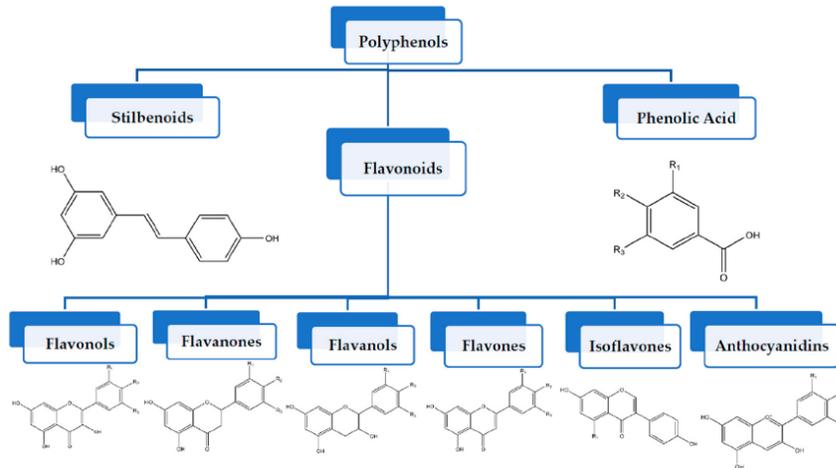


FIGURA 0-1

In un primo step ho selezionato alcune tecniche atte ad aumentare la biodisponibilità di tali composti, ho riportato, quindi, la documentazione scientifica che ne attesta l'efficacia, in vivo o in vitro.

In dettaglio, ho esaminato quelle tecniche che hanno come obiettivo finale l'efficacia terapeutica del composto somministrato che quindi non necessariamente portano al massimo aumento possibile della biodisponibilità di un singolo principio attivo. In questo scenario l'elevato tasso di clearance dei polifenoli potrebbe risultare un vantaggio.

Mi sono dedicata in particolare alle combinazioni di polifenoli e sostanze fitochimiche che possono influenzare le modifiche epigenetiche.

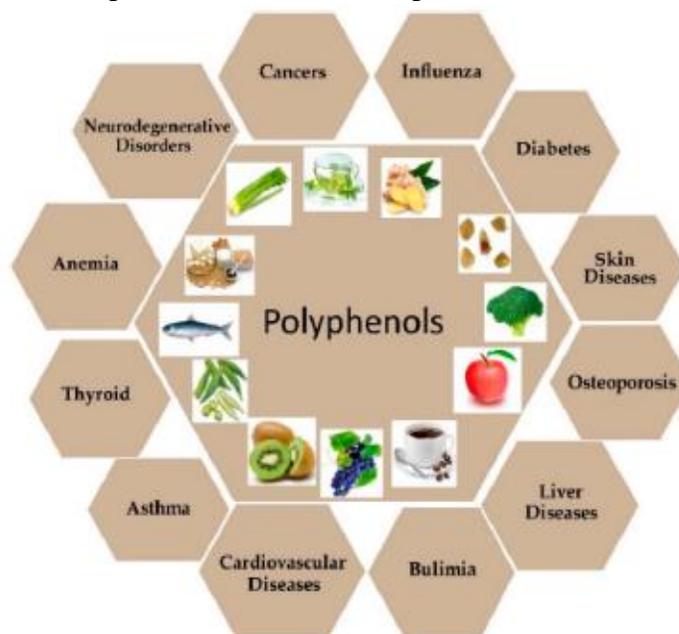
Nella fase conclusiva ho analizzato criticamente due formule di fitoterapici composti, a base di polifenoli, in termini di biodisponibilità dei principi attivi, in funzione delle finalità terapeutiche del composto stesso.

Capitolo 1: Proprietà dei polifenoli

La frutta, la verdura e le bevande, come il tè e il vino rosso, costituiscono le principali fonti di polifenoli per l'uomo. A causa della varietà e della complessità della loro struttura chimica, gli effetti benefici dei polifenoli contenuti nella dieta sono stati estesamente studiati solo negli ultimi anni.⁴

Questi composti, noti anche come *fenolici* per la loro struttura fenolica, svolgono un ruolo vitale nella prevenzione di varie malattie come diabete, malattie cardiovascolari, malattie neurodegenerative, malattie del fegato e tumori (fig. 0.2). Tuttavia, la funzione dei polifenoli nella prevenzione e nella terapia delle malattie dipende dal loro consumo dietetico e dalle proprietà biologiche. Relativamente di recente, numerosi studi hanno indicato che vari polifenoli dietetici e fitochimici possiedono proprietà di modifica epigenetica, meccanismi che modulano l'espressione genica. Questi polifenoli e i fitochimici, se somministrati in maniera dose-dipendente e combinatoria, possono avere una migliorata efficacia sui cambiamenti epigenetici che svolgono un ruolo cruciale ad esempio nella prevenzione e nella terapia del cancro.⁵

FIGURA 0-2



4 AAVV, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability", in Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, febbraio 2007.

5 AAVV, "Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy", in International Journal of molecular science, 14 settembre 2019.

Studi epidemiologici suggeriscono che un'elevata assunzione di polifenoli nella dieta sia associata a un ridotto rischio di una serie di malattie, tra cui quelle cardiovascolari (CVD), forme specifiche di cancro e malattie neurodegenerative. In particolare, un gruppo di polifenoli, noti come *flavonoidi*, è stato collegato con effetti benefici in molti studi sull'uomo, sugli animali e in vitro. Per quanto riguarda la salute cardiovascolare, i flavonoidi possono alterare il metabolismo lipidico, inibire l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL), ridurre la formazione di lesioni aterosclerotiche, inibire l'aggregazione piastrinica, ridurre l'espressione delle molecole di adesione delle cellule vascolari, migliorare la funzione endoteliale e ridurre la pressione sanguigna. Tuttavia, i flavonoidi hanno anche dimostrato di esercitare effetti cognitivi benefici: invertire la neurodegenerazione specifica correlata all'età ed esercitare una varietà di effetti anticancerogeni, inclusa la capacità di indurre l'apoptosi nelle cellule tumorali, inibire la proliferazione delle cellule tumorali e prevenire l'angiogenesi e l'invasione delle cellule tumorali.⁶

‘Tra le molecole attive come modulatori epigenetici (IEO - Istituto Europeo di Oncologia - Milano) troviamo: resveratrolo, fisetina, antocianine, quercetina, capsaicina, licopene, curcumina, epigallocatechin-gallato e, con l'avanzare della ricerca, se ne stanno aggiungendo altre. Purtroppo, non di rado, si tratta di sostanze con scarsa biodisponibilità o termolabili, sensibili non solo alla cottura, ma anche alle ordinarie condizioni di conservazione. Alcune sostanze, come la curcumina, sono composte da molecole pleiotropiche, nel senso che hanno bersagli molecolari che giustificano diverse azioni e possibili applicazioni; altri rimedi fitoterapici, di cui si cominciano ad evidenziare effetti di modulazione genica, sono l'uncaria tomentosa, lo zenzero, il cardo mariano, la bacopa monnieri, vari adattogeni (come panax ginseng, rodiola rosea, withania somnifera)’.⁷

‘Questi meccanismi terapeutici sono raggiunti attraverso le loro *proprietà antiossidanti* in quanto inibiscono l'attività della chinasi intracellulare, interrompendo la segnalazione cellula-cellula, si legano ai recettori della superficie cellulare e interrompono l'integrità delle membrane plasmatiche cellulari. Altri approcci terapeutici prevedono la somministrazione di polifenoli non modificati, come il resveratrolo: trattamento praticabile per le malattie croniche. Uno studio condotto sulla somministrazione preclinica di un estratto di uva contenente 8 mg di resveratrolo totale ad un

6 AAVV, “Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action”, in *Nutrients*, 8 Novembre 2010.

7 Biagi C., in *Lezione/Modulo di Fitogenomica - Master di Fitoterapia applicata*, Università Unicusano.

gruppo di pazienti con malattia coronarica, ha dimostrato un aumento dei fattori antiinfiammatori. Questo studio non ha riportato effetti collaterali avversi, nonostante la somministrazione ad alto livello di resveratrolo: ciò indica l'uso di polifenoli come terapia benefica anche grazie ai loro rapidi tassi di clearance.’⁸

‘Alla luce di quanto riportato si può affermare che, sebbene la maggior parte dei polifenoli abbia proprietà antiossidanti, queste ultime da sole non possono spiegare tutti i gli effetti biologici da loro mostrati. Studi recenti suggeriscono la presenza di meccanismi di azione di polifenoli nella protezione della cellula contro lo stress ossidativo, che potrebbero non dipendere dalle attività riducenti tipiche dell’antiossidante. Tali meccanismi potrebbero riguardare l’interazione con il signalling cellulare e l’influenza sull’espressione genica, con conseguente modulazione di specifiche attività enzimatiche, capaci di guidare la risposta intracellulare contro lo stress ossidativo. È altresì nota l’esistenza di una stretta correlazione tra antiossidanti endogeni ed esogeni che agiscono in modo strettamente coordinato. Dati sperimentali dimostrano che i polifenoli determinano un rafforzamento delle difese antiossidanti endogene e che questo potenziamento si ottiene attraverso l’attivazione degli elementi di risposta antiossidante (antioxidant responsive elements, ARE), coinvolti nella induzione di enzimi antiossidanti e detossificanti. I polifenoli inducono l’espressione dei geni codificanti per gli enzimi di Fase II attraverso le vie intracellulari di attivazione degli ARE’.⁹

Riassumo ora brevemente le proprietà terapeutiche dei quattro composti selezionati.

La **curcumina** è estratta dalla *curcuma*, pianta descritta nelle monografie dell’Organizzazione Mondiale della Sanità. Grazie alla presenza di curcumina, studi clinici hanno dimostrato che la pianta è in possesso di proprietà terapeutiche nei confronti di dispepsia e ulcera peptica, è inoltre dimostrato che sia un efficace farmaco antiinfiammatorio su pazienti affetti da artrite reumatoide. La curcumina ha ricevuto un’attenzione diffusa nell’ultimo decennio in seguito alle scoperte in vitro che hanno mostrato la sua influenza su molti meccanismi biologici associati a diverse malattie. In particolare, modelli in vitro e su specie animali hanno confermato le sue proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, antitumorali, antivirali ed effetti neurotrofici. Altre indagini hanno

8 AAVV, “Polyphenols: Mechanisms of action in human health and disease”, second edition-Volume 1, in Academic Press.

9 Occhionero G., in Lezione/Modulo di Fitogenomica - Master di Fitoterapia applicata, Università Unicusano.

mostrato anche il potenziale della curcumina per il trattamento di diversi tumori, malattie gastrointestinali, malattie metaboliche, dermatologiche, malattie cardiovascolari, neurodegenerative, condizioni autoimmuni e disturbi psichiatrici.¹⁰

La curcumina ha azione antiinfiammatoria sia in casi di infiammazione acuta che cronica, è in grado infatti di diminuire l'attività della cicloossigenasi (sulla quale agiscono gli antiinfiammatori non steroidei) e di bloccare la lipoossigenasi (sulla quale agiscono gli antiinfiammatori steroidei): ha quindi una duplice azione, correlata ad una bassissima tossicità, in grado di aumentare la produzione di steroidi endogeni, agendo sulla corteccia del surrene, e di inibire il metabolismo epatico del cortisone. Ha inoltre azione antiradicalica ed antiossidante, mentre per una frazione polisaccaridica della curcuma è stata dimostrata attività immunostimolante. Ha un effetto di blando spasmolitico a livello delle vie biliari e intestinali e viene impiegata nella medicina tradizionale indiana e in quella cinese come disintossicante dell'organismo, in particolare del fegato. Il rizoma viene prescritto per le proprietà coleretiche e colagoghe nei disturbi funzionali dei processi digestivi attribuibili ad una origine epatica e per stimolare l'appetito.¹¹

Il **resveratrolo** (RV): un polifenolo naturale (trans-3,40,5-triidrossistilbene) possiede proprietà antinfiammatorie, antitumorali e antiossidanti, le quali possono essere sfruttate nelle strategie contro le malattie croniche. Le principali fonti di RV includono, soprattutto, l'uva (*vitis vinifera* L.), una varietà di bacche, le arachidi, o piante medicinali, come il poligono giapponese o il vino rosso. Studi del RV sui benefici per la salute hanno riportato una riduzione dei sintomi associati all'età e la prevenzione della mortalità precoce negli animali. Il RV è anche associato a un rallentamento, o prevenzione, del deterioramento cognitivo. I potenziali meccanismi di azione del RV, responsabili degli effetti sulla salute, sono numerosi: il RV innesca l'espressione in un'ampia gamma di enzimi antiossidanti, di conseguenza porta a una diminuzione complessiva dello stress ossidativo.¹²

I flavonoidi derivati dalla **catechina** sono abbondanti nelle diete di soggetti umani; il tè verde, ad esempio, è una fonte alimentare di catechine, studi epidemiologici ne hanno evidenziato le proprietà chemiopreventive contro varie tipologie di tumori, come quelli della pelle, dei polmoni,

10 Lopresti A., "The Problem of Curcumin and Its Bioavailability: Could Its Gastrointestinal Influence Contribute to Its Overall Health-Enhancing Effects?", in American Society for Nutrition, 2018.

11 Giordanengo C., "Fitopreparazione in farmacia: allestimento, controllo di qualità e studio di stabilità", in Tesi di laurea 2009-2010.

12 AAVV, "Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials", in Nutrients, dicembre 2018.

e della prostata: le catechine, infatti, sono responsabili di una varietà di attività fisiologiche come antiossidanti, antimicrobici, antivirali, e attività antiangiogeniche. ¹³

Si riporta infine in fig. 0-3 una tabella che mostra la valutazione dei polifenoli, delle modificazioni epigenetiche associate a dei meccanismi molecolari (studi in vivo e in vitro) nel cancro. ¹⁴

Curcumin	DNMT inhibitor	<i>CDKN2B, NEUROG1, NFE2L2, Nr2, Neurog1</i>	↓ Proliferation	40 µM	Breast cancer (MCF-7 cells) Prostate cancer (LnCap cells) Colorectal cancer (HCT116, HT29 and RKO cell lines) Gastric cancer (MiaPaCa-2, PANC-1 cells) Breast cancer (MCF-7 cells) Ovarian cancer (SKOV3 cells)
	HAT inhibitor	<i>RASSF1A, p16, SPARC,</i>	↑ Apoptosis	0-100 µM	
	HDAC1 inhibitor	<i>SOCS1, SOCS3, p53, p21,</i>	↓ ERK, MKK4, JNK activity	0-50 µM	
	Down-regulation of histone methylation	<i>GAS5, HOTAIR, H19,</i>	↓ Bcl-2	2.5-160 µM	
		<i>AF086415, AK095147, RPI-17916.3, MUDENG, AK056098, AK294004</i>	↓ Akt expression	7.5-10 µM	
		↑ p38 activation	0-50 µM		
			↓ Cell viability		
			↑ Bax Activity		
EGCG	DNMT inhibitor		↓ Invasiveness	1-40 µM	Breast cancer (MCF-7 cells) Colorectal cancer (HT-29 cells) Lung cancer (CL1-5 cells) Gastric cancer (MKN-1, MKN-28, MKN-45, Xenograft mice) NUGC-3 and TMK-1) Colorectal cancer Skin cancer (A431 cells)
	HAT inhibitor	<i>p16INK4a; RARβ; MGMT;</i>	↓ Proliferation	1-50 µM	
	Down-regulation of histone methylation	<i>hMLH1; GSTP1; WIF-1;</i>	↑ Apoptosis	5-20 µM	
		<i>RECK, Cipl/p21</i>	↑ Caspase 3 Activity	20-100 µM	
	Effect on histone ubiquitination	<i>ATI02202, p53, p21</i>	↑ Caspase 8 Activity	1-50 µM	
	Upregulation of histone phosphorylation		↑ Cytochrome c	0-20 µg/mL	
Resveratrol	DNMT3a inhibitor	<i>PTEN, XRCC1, p21 p16,</i>	↓ Proliferation	50-150 µM	Breast cancer (MCF-7 cells) Lung cancer (H1703 and H1975 cells) Gastric cancer (Ki67 cells) Colon cancer (HT-29 cells, COLO 21 cells) Xenograft Mice Prostate cancer (PC3 and DU145 cells) Cervical cancer Liver cancer (Huh7 cells)
	DNMT3b inhibitor	<i>MDR1, SP-1, STIM1,</i>	↑ Apoptosis	5-50 µM	
	Decreased SIRT1, SIRT2, and SIRT3 activity	<i>FOXO, PCGEM1, PRNCRI, PCAT29,</i>	↓ Metastasis	50-200 µM	
	HAT inhibitor	<i>AK001796, MALATI,</i>	↑ Caspase 8/9 activity	20-150 µM	
	Regulation of histone phosphorylation	<i>u-Eleanor, LINC00978, p53, p21</i>	↑ Bax Activity	25-100 µM	
			↓ Bcl-2 Activity	150-250 µM	

*↓- decreased, ↑- increased.

FIGURA 0-3

La **silimarina** (SM), un estratto della pianta del *silybum arianum* (cardo mariano) contiene vari flavonolignani (di cui la silibina è la principale). Il *cardo mariano* è descritto nella monografia dell'Organizzazione Mondiale della Sanità: grazie alla presenza della silimarina, ha dimostrato a livello clinico proprietà terapeutiche per il trattamento di supporto delle epatiti acute e croniche e delle cirrosi indotte da alcool, farmaci o tossine.

Le proprietà antiossidanti della SM sono considerate responsabili delle sue azioni protettive; i suoi meccanismi antiossidanti sono stati ampiamente studiati: elimina in modo diretto i radicali liberi nell'intestino, previene la formazione di radicali liberi, inibendo specifici enzimi che producono ROS, mantiene nella cellula un equilibrio redox ottimale, attivando una serie di enzimi antiossidanti e antiossidanti non enzimatici, diminuisce le risposte infiammatorie inibendo le vie

13 AAVV, "The Role of Polyphenolic Antioxidants in Health, Disease, and Aging", in REJUVENATION RESEARCH, Volume 13 - Number 6, 2010.

14 AAVV, "Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy", in Journal of Molecular Science, 14 September 2019.

dell'inflammation Nrf2 e NF-κB. La SM viene anche studiata come ingrediente epato-, neuro- nefro e cardioprotettivo, grazie alle sue forti proprietà antiossidanti e rigenerative dei tessuti.¹⁵

Capitolo 2: *Analisi specifica della biodisponibilità dei polifenoli*

La biodisponibilità può essere definita in diversi modi, la definizione comunemente accettata è la *proporzione del nutriente che viene digerito, assorbito e metabolizzato attraverso percorsi normali*; di conseguenza, non è solo importante sapere quanta sostanza nutritiva è presente in specifici alimenti o integratori alimentari, ma soprattutto quanto di ciò è biodisponibile.

Generalmente gli alimenti contengono miscele complesse di polifenoli. Numerosi fattori, come la maturità al momento del raccolto, i fattori di conservazione, possono influenzare il contenuto di polifenoli delle piante; i fattori ambientali, come il clima (esposizione al sole, alla pioggia), o il fattore agronomico (tipo diverso di cultura, resa della frutta per albero) svolgono un ruolo chiave nel determinare il contenuto di polifenoli, l'esposizione alla luce, in particolare, ha un effetto considerevole sulla maggior parte dei flavonoidi. Il contenuto di polifenoli negli alimenti è influenzato anche dai metodi di preparazione culinaria; il semplice peeling di frutta e verdura può ridurre significativamente il contenuto di polifenoli, poiché queste sostanze sono spesso presenti in alte concentrazioni nelle parti esterne: cipolle e pomodori perdono, ad esempio, circa il 75% del loro contenuto iniziale di quercetina dopo l'ebollizione per 15 minuti, il 65% dopo la cottura in forno a microonde e il 30% dopo la frittura. Le patate contengono fino a 190 mg di acido clorogenico / kg principalmente nella buccia, quindi durante la cottura si verifica un'estesa perdita e non sono stati trovati acidi fenolici residui nelle patatine fritte.

Il metabolismo di diversi polifenoli è ora ben compreso. Generalmente, gli agliconi possono essere assorbiti dall'intestino tenue; tuttavia, la maggior parte dei polifenoli sono presenti negli alimenti sotto forma di esteri, glicosidi o polimeri che non possono essere assorbiti nella forma nativa: prima dell'assorbimento questi composti devono essere idrolizzati dagli enzimi intestinali o dalla

15 Surai P.F., "Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives", in Antioxidants, 2015.

microflora del colon. Nel corso dell'assorbimento, i polifenoli subiscono ampie modifiche; sono coniugati nelle cellule intestinali e successivamente nel fegato per metilazione, solfatazione e/o glucuronidazione. L'obiettivo principale degli studi di biodisponibilità è quello di determinare quali sono i polifenoli meglio assorbiti, quali sono i metaboliti attivi e quali polifenoli portano alla formazione dei metaboliti attivi: la struttura chimica dei polifenoli, più della concentrazione, determina la velocità e l'estensione dell'assorbimento e la natura dei metaboliti che circolano nel plasma. I polifenoli più comuni nella nostra dieta non sono necessariamente quelli che portano alle più alte concentrazioni di metaboliti attivi nei tessuti bersaglio, di conseguenza le proprietà biologiche dei polifenoli differiscono notevolmente da un polifenolo all'altro.

La prova, sebbene indiretta, del loro assorbimento attraverso la barriera intestinale è data dall'aumento della capacità antiossidante del plasma dopo il consumo di alimenti ricchi di polifenoli; ulteriori prove dirette sulla biodisponibilità dei composti fenolici sono state ottenute misurando la loro concentrazione nel plasma e nelle urine dopo l'ingestione di composti puri o alimenti con contenuto noto dei composti di interesse.

Negli alimenti tutti i flavonoidi, ad eccezione dei flavanoli, esistono in forme glicosilate. Il destino dei glicosidi nello stomaco non è ancora chiaro: la maggior parte dei glicosidi probabilmente resiste all'idrolisi acida nello stomaco e quindi arriva intatta nell'intestino dove possono essere assorbiti solo agliconi e pochi glucosidi. La glicosilazione influenza l'assorbimento, ma generalmente non influenza la natura dei metaboliti circolanti. È noto che la glicosilazione del resveratrolo lo protegge dalla degradazione ossidativa, pertanto il resveratrolo glicosilato è più stabile e più solubile e facilmente assorbito nel tratto gastrointestinale umano.

Una volta assorbiti, i polifenoli sono sottoposti a coniugazione: questo processo, che include principalmente metilazione, solfatazione e glucuronidazione, rappresenta un fenomeno di disintossicazione metabolica, comune a molti xenobiotici, che facilita la loro eliminazione biliare e urinaria aumentando la loro idrofilia. I meccanismi di coniugazione sono altamente efficienti e gli agliconi liberi sono generalmente assenti o presenti in basse concentrazioni nel plasma dopo il consumo di dosi nutrizionali: un'eccezione sono le catechine del tè verde, i cui agliconi possono costituire una porzione significativa della quantità totale nel plasma (fino al 77% per l'epigallocatechina gallato).

Nella fig. 0-4 sono mostrati i dati degli studi di biodisponibilità di varie classi di polifenoli più rilevanti nell'uomo; inoltre, la stessa tabella indica la fonte di polifenoli, la quantità di polifenoli ingerita, la massima concentrazione nel plasma e la escrezione urinaria quando disponibile. Le concentrazioni plasmatiche di flavonoidi intatti raramente superano $1\mu\text{M}$ e il mantenimento di un'alta concentrazione di polifenoli nel plasma richiede ingestione ripetuta nel tempo; infatti, le concentrazioni massime vengono spesso raggiunte una o due ore dopo l'ingestione.

I polifenoli sono in grado di penetrare nei tessuti, in particolare quelli in cui sono metabolizzati, come intestino e fegato; la determinazione della biodisponibilità dei metaboliti dei polifenoli nei tessuti può essere molto più importante della conoscenza delle loro concentrazioni plasmatiche. Tuttavia, i dati sono ancora molto scarsi, non solo nell'uomo ma anche negli animali, poiché sono in numero limitato gli studi che hanno riportato dati sulle concentrazioni di polifenoli nei tessuti umani.

Table 1 | Bioavailability of polyphenols or polyphenol-containing foods

Polyphenols	Source	Quantity of polyphenol ingested (mg)	Maximum concentration in plasma (nM)	Urinary excretion (% of intake)
Anthocyanins				
Cyanidine 3-glucoside	Orange juice (1 L)	71 mg Cy-3-glc	0.002	
Malvidin 3-glucoside	Red wine (500 mL)	68 mg Mal-3-glc	0.001	0.016 6h
Malvidin 3-glucoside	Red grape juice (500 mL)	117 mg Mal-3-glc	0.003	0.019 6h
Cyanidine 3-glucoside	Red fruit extract (1.6 g)	2.7 mg Cy-3-glc/kg bw	0.03	
Flavanols				
Epigallocatechin gallate	Green tea infusion (5 g)	105 mg	0.13-0.31	
Catechin	Red wine (120 mL)	34 mg	0.072	
Epicatechin	Chocolate (80 g)	137 mg	0.26	
Catechin	Pure compound	0.36 mg/kg bw	0.14-0.49	1.2-3
Epigallocatechin gallate	Pure compound	50-1600 mg	0.28-7.4	
Epigallocatechin gallate	Green tea extract	110-328 mg	0.26-0.7	
Catechins	Black tea	140 mg	0.34	
Procyanidin B1	Grapeseed extract	18 mg	0.011	
Flavanones				
Hesperidin	Orange juice	61 mg	0.48	4.1
Hesperetin	Orange juice	110-220 mg	0.46-1.28	4.1-6.4
Naringenin	Orange juice	22.6-45 mg	0.06-0.2	7.1-7.8
Naringenin	Grapefruit juice	199 mg	5.99	30.2
Naringenin	Pure compound	135 mg	7.4	5.8
Hesperetin	Pure compound	135 mg	2.7	3.3
Flavonols				
Quercetin	Apples	107 mg	0.3	3.5
Quercetin	Onions	100 mg	7.6	6.4
Quercetin 4'-glucoside	Pure compound	100 mg	7.0	4.5
Quercetin	Buckwheat tea	200 mg	2.1	1.0
Quercetin	Pure rutin	200 mg	1.1	0.9
Isoflavones				
Daidzein	Soy milk	108 mg	0.47	37.3
Genistein	Soy milk	102 mg	0.41	20.2
Glycitein	Soy milk	114 mg	0.09	
Daidzein	Pure compound	50 mg	0.76	
Genistein	Pure compound	50 mg	1.26	
Glycitein	Pure compound	25 mg	0.72	
Daidzein	Soy extract	0.28-0.84 mg/kg bw	1.7-9.0	26-42
Genistein	Soy extract	2-16 mg/kg bw	3.4-25.4	9.5-14
Daidzein	Soy nuts	6.6-26.4 mg	0.4-1.65	63-44
Genistein	Soy nuts	9.8-39.2 mg	0.59-2.21	25.2-15.8
Hydroxybenzoic acids				
Gallic acid	Pure compound	50 mg	1.8GA+2.3 MeGA	
Gallic acid	Assam black tea	50 mg	1.8GA+2.3 MeGA	36.4
Gallic acid	Red wine (300 mL)	4 mg	1.8GA+2.3 MeGA	39.6
Hydroxycinnamic acids				
Chlorogenic acid	Coffee (200 mL)	96 mg	0.5 caffeic acid	
Caffeic acid	Red wine (200 mL)	1.8 mg	0.06	
Caffeic acid	Red wine	0.06 mg	0.08	
Hydrocinnamic acids	Apple cider (1.1 L)	15 mg	0.43	

GA: gallic acid; MeGA: methylgallic acid; bw: body weight.

Figura 0-4¹⁶

Vediamo ora l'analisi specifica delle biodisponibilità dei composti selezionati.

La **curcumina**, fitocomposto a struttura polifenolica, non è assorbibile per diffusione passiva, sia a causa delle sue grandi dimensioni molecolari, sia per la scarsa miscibilità a livello delle membrane intestinali, non è inoltre soggetta ad assorbimento attivo, tramite trasportatori specifici

16 AAVV, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability", in Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, febbraio 2007.

l'assorbimento di questa sostanza è quindi molto limitato. Studi su soggetti volontari dimostrarono che il 50/75% della curcumina attraversa tutto il sistema digerente senza essere trasformata e come tale viene eliminata; tracce di curcumina sono state ritrovate nel sangue dopo somministrazione orale di due giorni.

‘Per la sua efficacia nel promuovere attività terapeutiche, si marcò la curcumina con elementi radioattivi, per seguire esattamente il percorso dopo la sua somministrazione; un’alta radioattività fu riscontrata nel sangue e negli organi bersaglio. Il 60% della curcumina era stato trasformato a livello intestinale e assorbito sotto forma di “metaboliti”, proprio questi ultimi hanno azione terapeutica.

La parte più consistente veniva eliminata con le feci, in misura minore attraverso le urine. Dosi elevate somministrate per via orale furono riscontrate nel sangue anche il giorno successivo all’assunzione (Cuomo et al., 2011).

Studi effettuati sui roditori hanno evidenziato che la principale via metabolica è quella epatica che procede tramite riduzioni successive ed estese della molecola (attraverso il complesso alcol-deidrogenasi), seguite dalla coniugazione con acido glucuronico o solforico: i maggiori metaboliti sono tutti escreti nella bile.

Nell’ultimo decennio, studi fitocinetici condotti sulle reazioni dell’uomo alla curcumina hanno confermato le conclusioni delle ricerche sperimentali.

Uno studio su 25 pazienti, con lesioni enteriche pre-maligne, ha evidenziato che dosi di 4-8 g/die per tre mesi hanno condotto a livelli sierici di curcumina inferiori a 1-2 µg/ml, indicando che la curcumina viene scarsamente assorbita e ha una disponibilità sistemica molto limitata (Prucksunand et al., 2001). Studi condotti su soggetti volontari sani hanno rivelato che per dosi oltre 10 g potrebbero saturarsi i meccanismi di trasporto intestinali della curcumina stessa. Inoltre, la clearance plasmatica, cioè la quantità di sangue depurata in un minuto dalla curcumina, ha avuto un picco di concentrazioni 1-2 ore dopo l’assunzione, seguito da un rapido declino dei livelli plasmatici. Nell’uomo è stata misurata una concentrazione di curcumina nei tessuti dell’apparato digerente circa mille volte superiore a quella plasmatica. La bassa biodisponibilità sistemica della curcumina sembrerebbe limitare lo spettro di attività nel tratto gastroenterico (Prucksunand et al., 2001). In ogni caso, moltissimi studi hanno dimostrato un’attività fitoterapica nel sistema nervoso centrale, nel sistema immunitario, nel polmone, nel fegato, nel rene, nella cistifellea e nel sangue.

Attualmente la curcumina libera rimane sotto il livello plasmatico di 25 nM con dosaggi quotidiani di 3,6-12 g per una settimana e questa scarsissima biodisponibilità è complicata da una notevole variabilità individuale di assorbimento enterico (Prucksunand et al., 2001). I principali problemi che si traducono in una biodisponibilità orale insufficiente sono i seguenti:

- instabilità molecolare
- scarsa solubilità in acqua
- assorbimento enterico bassissimo
- rapida riduzione e coniugazione a livello epatico
- escrezione immediata

17

Per quanto riguarda il **resveratrolo** vi sono studi clinici sull'uomo condotti nell'ultimo decennio nei quali si determina la quantità di RV nel plasma umano, nelle urine o nelle feci. La biodisponibilità e la farmacocinetica di RV dipendono dalle dosi ingerite, dall'ingestione concomitante di matrice alimentare, dalla dimensione delle particelle, dal microbiota intestinale e dalla variazione circadiana.

I risultati suggeriscono che una somministrazione ripetuta e moderata di RV sia migliore della somministrazione di una singola dose più alta; una dose sicura ed efficiente è di almeno 1 g al giorno, tuttavia, l'assunzione di RV è sicura ad una dose fino a 5 g, sebbene tutti possano manifestare effetti avversi diversi. Inoltre, gli studi hanno dimostrato che l'escrezione si verifica principalmente entro le prime quattro ore dall'ingestione. La maggior parte dei preparati con RV, indipendentemente dal successo commerciale, risulta comunque assolutamente sotto dosata: sulla base delle conoscenze attuali un dosaggio adeguato di RV corrisponderebbe circa a 150 mg/die, i prodotti attualmente in commercio ne contengono circa 20 volte di meno. Il comportamento del RV dopo assunzione orale è particolarmente curioso: è assorbito addirittura fino al 70% nell'uomo, ma solo l'1% si trova libero, non glucuronato e non solfatato, solo questa quota può essere considerata funzionante; si cerca quindi da anni di incrementare il rapporto tra forma libera e forma coniugata, oggi è di circa 1:20.¹⁸

17 Campo J., "Proprietà nutraceutiche dei principi attivi naturali: i curcuminoidi", in Tesi di laurea 2012-2013.

18 AAVV, "Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials", in Nutrients, 3 dicembre 2018.

La biodisponibilità del resveratrolo è generalmente caratterizzata dalla quantificazione delle concentrazioni plasmatiche o sieriche, ma ciò non considera il resveratrolo presente nei globuli rossi o quello che è stato distribuito ad altri tessuti. Pertanto, la valutazione del resveratrolo nel plasma rappresenta solo una piccola parte di quella effettivamente presente nel sangue e potrebbe non essere un indicatore accurato dell'assorbimento e dell'esposizione. Inoltre, va ricordato che il sangue rappresenta solo un tessuto bersaglio biologico: mentre la rimozione attraverso il sistema epatobiliare e renale rappresenta un aspetto della clearance; il resveratrolo si accumula in altri tessuti dove può avere effetti benefici, come cuore, fegato e muscolo scheletrico. Come notato in precedenza, la distribuzione tissutale aumenta nonostante una concentrazione ematica inferiore quattro ore dopo la somministrazione di una formulazione di nanoparticelle di resveratrolo: i parametri di biodisponibilità possono essere molto utili nella valutazione dell'esposizione endoteliale, ma potrebbero non essere rappresentativi dell'esposizione diffusa dei tessuti.¹⁹

Altri studi suggeriscono che la dose di resveratrolo efficace a lungo termine per l'essere umano varia probabilmente da 10 a 120 mg/die, mentre dosi più elevate, fino a 200 mg / die, potrebbero essere prese in considerazione laddove esista la necessità, dosi oltre questo limite potrebbero non solo non essere necessarie, ma potrebbero anche rivelarsi pericolose con un uso prolungato. Una dose giornaliera di resveratrolo di 100 mg rientra certamente nei regni delle dosi tradizionali utilizzate per le erbe cinesi.²⁰

Esempio di calcolo di intake in grammi: necessario per avere 5 micromoli disponibili di RV - considerando una biodisponibilità dell'1%

Peso atomico del resveratrolo = 228,243 grammi su mole

$228,243 \text{ (g/m)} \times 10^3 \text{ (conversione in mg)} \times 5 \times 10^{-6} \text{ (micro-moli)} = 1,4 \text{ mg}$

5 micromoli di resveratrolo corrispondono a 1,4 mg di resveratrolo disponibile = 140 mg di intake

È stato stimato che l'assunzione giornaliera di **catechine** è di 18-50 mg / die le cui principali fonti sono tè, cioccolato, mele, pere, uva e vino rosso. Sebbene siano presenti in molti frutti e nel vino

19 AAVV, "Enhancing the Delivery of Resveratrol in Humans: If Low Bioavailability is the Problem, What is the Solution?", in *Molecules* 2014.

20 AAVV, "Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy", in *International Journal of molecular science*, 14 settembre 2019.

rosso, la biodisponibilità delle catechine è stata studiata principalmente dopo ingestione di cacao o tè. L'EGCG è l'unico polifenolo noto presente nel plasma, in proporzione, in grandi quantità (77-90%) in una forma libera.²¹

Dopo aver bevuto il tè, solo una piccola frazione delle catechine, presenti nel tratto intestinale, può essere assorbita e quindi considerata biodisponibile, cioè apparire nel sangue e nei tessuti o raggiungere la circolazione sistemica. Uno studio dimostra che la concentrazione di catechine negli infusi di tè verde è di circa 3250–4410 mg /L. I test hanno mostrato che meno del 5% della dose somministrata per via orale di catechine del tè raggiunge la circolazione sistemica nel ratto e circa l'1,68% delle catechine ingerite è presente nel plasma umano (0,16%), nelle urine (1,1%) e nelle feci (0,42%) dopo l'ingestione di tè per oltre 6 ore. Lo studio di farmacocinetica ha mostrato che dopo somministrazione orale di tè ai ratti, circa il 14% di (-) - epigallocatechina (EGC), il 31% di (-) - epicatechina (EC) e <1% di (-) - epigallocatechina-3 -gallato (EGCG) è apparso nel sangue. Per gli esseri umani, dopo la somministrazione di 3g di tè verde decaffeinato, la concentrazione plasmatica massima di EGCG, EGC ed EC è rispettivamente di 0,57, 1,60 e 0,6 µM .

Una frazione delle catechine del tè ingerite subisce un ampio metabolismo da parte degli enzimi di Fase II, prima e dopo essere state assorbite prevalentemente nell'intestino tenue e nel fegato, mentre le restanti entrano nel colon. Le catechine che passano nel colon vengono degradate in diversi anelli flavonoidi dai microrganismi residenti. Gli acidi fenolici catabolizzati possono essere riassorbiti nella circolazione o escreti nelle urine; le catechine e i loro metaboliti coniugati, piccoli acidi fenolici molecolari catabolizzati, possono essere distribuiti in organi e tessuti diversi, dove svolgono varie azioni biologiche.

Non è stato trovato alcun recettore specifico sulla superficie delle cellule epiteliali dell'intestino tenue per trasportare l'EGCG nelle cellule: il meccanismo per il trasporto delle catechine attraverso l'epitelio si basa principalmente sulla diffusione passiva, comprese le diffusioni paracellulari e transcellulari.

21 AAVV, "Health Effects and Bioavailability of Dietary Flavonols", in Free radical Research.

In breve, molti processi tra cui la degradazione chimica, il metabolismo microbico, il metabolismo intestinale ed epatico, la permeabilità della membrana e i mediatori del trasportatore possono influenzare la biodisponibilità delle catechine.²²

Per la **silimarina** (SM), e le sue principali fonti costituenti, il metabolismo e la biodisponibilità sono stati ampiamente studiati: è stato dimostrato che, dopo l'assunzione orale, la silibinina è caratterizzata da una disponibilità relativamente bassa, ad esempio nei ratti è solo dello 0,95% circa. Dopo la somministrazione orale dell'estratto standardizzato di cardo mariano, i flavonolignani sono stati rapidamente assorbiti ed eliminati con un'emivita di silibinina di 6 ore. La principale via di biotrasformazione di silibina e dei suoi derivati è stata identificata come la coniugazione. È interessante notare che la silibinina, simile ad altri flavonoidi, è riconosciuta dall'organismo come sostanza estranea e rapidamente metabolizzata attraverso gli enzimi di Fase II. La silibinina presente nella circolazione sistemica è stata trovata principalmente in forma coniugata. Infatti, dopo somministrazione orale di SM a volontari sani, solo il 10% - 17% della silibinina totale nel plasma è stato trovato in forma non coniugata libera. Pertanto, simile ad altri flavonoidi, dopo l'assunzione orale di silibinina, il principale costituente della SM, è caratterizzato da una disponibilità relativamente bassa, un metabolismo rapido e la sua concentrazione nel plasma è principalmente nell'intervallo nano-molare e, solo in alcuni casi, raggiunge concentrazioni micro-molari.

La concentrazione attiva di silibinina libera nel plasma, dopo il consumo orale di SM, a seconda della dose di integrazione, potrebbe essere nell'intervallo 0,2–2,0 μM . In soggetti volontari sani, ad esempio, dopo una somministrazione orale di SM (equivalente a 120 mg di silibinina), la concentrazione totale (non coniugata + coniugata) di silibinina nel plasma era di 1,1–1,3 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Una biodisponibilità della silibinina inferiore è stata dimostrata in un altro studio con una dose maggiore di consumo di SM (equivalente a 240mg di silibinina), dove la concentrazione massima di silibinina era di circa 0,7 μM ; concentrazioni comparabili di silibinina (0,3-1,9 μM) sono state riportate in soggetti volontari sani che hanno ricevuto circa 240 mg di silibinina. È stato dimostrato

22 AAVV, "Bioavailability of Tea Catechins and Its Improvements", in *Molecules*, August 2018.

che le concentrazioni di silibinina libera e coniugata nei tessuti bersaglio dei topi raggiungono i loro livelli massimi entro un'ora dopo la somministrazione di 50 mg/kg di silibinina.²³

Capitolo 3: *Tecniche migliorative della biodisponibilità dei principi attivi trattati*

‘Il modo più semplice per ridurre il dosaggio di un farmaco, mantenendone inalterato il successo terapeutico, è quello di incrementarne la biodisponibilità. Prendiamo ad esempio gli antibiotici assunti per via orale; un soggetto infetto deve assumerne un quantitativo che tenga conto di almeno 4 aspetti poco considerati durante il suo utilizzo:

1. un incompleto assorbimento intestinale;
2. una considerevole demolizione epatica;
3. un incompleto assorbimento da parte dei microbi infettanti;
4. l'incessante lavoro delle pompe di estrusione posizionate tanto nei tessuti del paziente, fattore che ne limita l'assorbimento intestinale, quanto nella parete dei batteri, situazione che riduce la reale efficacia antibiotica.

Un modo per ridurre il dosaggio, mantenendo invariata l'efficacia, è quello di creare sinergie ad hoc: queste stesse considerazioni valgono anche quando si vuole somministrare un preparato erbale, sarebbe un po' come sfruttare il ben noto problema dell'interazione farmaco-fitoterapico. Invece di subirla, potrebbe essere utilizzata a proprio vantaggio.

In realtà lo si può già fare: i potenziatori erbali di biodisponibilità orale sono infatti noti dal 1979, anno nel quale la piperina, alcaloide estraibile sia da *piper nigrum* che da *piper longum*, venne decretata essere il primo herbal bioenhancer (bio-incrementatore erbale; ma in inglese suona

23 Surai P.F., "Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives", in Antioxidants 2015.

meglio). In realtà, e ad onor del vero, la medicina ayurvedica già 2600 anni fa riportava l'effetto potenziante di altre droghe, impiegate a scopo medicinale.

Perché un composto somministrato per via orale eserciti un effetto clinico deve raggiungere la circolazione plasmatica, per fare questo deve superare una serie di sbarramenti. Il primo è quello *gastrico*: il basso pH gastrico può infatti danneggiare il composto attivo; questa possibilità è tanto più grande, in un estratto erbale, quanto più elevato è il suo grado di purificazione: più il principio attivo è inserito in una miscellanea di composti diversi, minore è la possibilità che il pH gastrico lo danneggi. Il secondo è quello *intestinale*; caratterizzato, tra le sue varie funzioni, dall'essere la struttura preposta a filtrare cosa deve essere assorbito e raggiungere il fegato e cosa debba invece rimanere al suo interno per essere eliminato con le feci, lo sbarramento intestinale è costituito principalmente da una linea di enterociti strettamente interconnessi e legati l'uno con l'altro attraverso giunzioni serrate e rivestiti da una sottile pellicola acquosa. I principi attivi, superato indenne lo sbarramento gastrico, si trovano ad interagire proprio con questa prima pellicola idrofila e solo superata quest'ultima possono entrare in contatto con il doppio strato lipidico delle membrane enterocitarie. La pellicola acquosa è quindi una barriera per le sostanze molto lipofile (ad esempio il coenzima Q10) che proprio per questo sono difficilmente assorbite. Le membrane enterocitarie sono al contrario una barriera per le sostanze idrofile che, in assenza di trasportatori dedicati, sono scarsamente assorbite. Le giunzioni serrate sono infine una barriera per quelle sostanze che, limitate nell'attraversamento della barriera intestinale dallo strato acquoso e/o dalle membrane enterocitarie, tentano l'attraversamento tra un enterocita e l'altro. Anche le dimensioni molecolari hanno comunque una loro rilevanza intrinseca per quanto concerne l'attraversamento della barriera intestinale. La triade descritta in precedenza (film acquoso, membrane enterocitarie, giunzioni serrate), al di là delle caratteristiche chimico-fisiche di un ingrediente attivo, rende infatti difficoltosa la penetrazione di sostanze più grandi di 0.4 nanometri. In ultima analisi, l'intestino è ricco sia di citocromi, principalmente ossido-reduttasi capaci di modificare chimicamente, e quindi anche di inattivare, alcuni principi attivi, che di pompe di estrusione che rigettano nel lume intestinale quelle sostanze che erano riuscite a penetrare all'interno del citoplasma dell'enterocita. Terzo sbarramento è il *fegato*: struttura di detossificazione per eccellenza, il fegato è preposto, tra i suoi vari compiti, anche alla neutralizzazione di quei composti a scarso valore nutrizionale e/o ritenuti pericolosi, che in qualche modo sono stati in grado di sfuggire ai due precedenti sbarramenti

e ai numerosi sistemi barriera, precedentemente elencati, preposti ad impedire alle sostanze di raggiungerlo. Superare indenni anche il fegato vuol dire raggiungere la circolazione sistemica e quindi virtualmente, in pochi secondi, qualunque cellula dell'intero organismo: il fegato è quindi l'ultimo sbarramento da superare. Qui, come abbiamo visto, sistemi enzimatici di Fase I (ossidoreduzioni) e di Fase II (enzimi coniuganti, principalmente glucuronidasi e solfatasi) lavorano incessantemente, e il loro lavoro produce effetti.

Per l'organismo una qualunque sostanza potenzialmente pericolosa, arrivata attraverso il sistema portale dall'intestino, deve essere distrutta e eliminata dall'organismo stesso al più presto.

Per incrementare quindi l'assorbimento di una molecola scarsamente assorbita a causa di una o più di una delle motivazioni prima elencate, una sostanza deve essere in grado di interagire, contrastandolo, con uno o più dei sistemi che costituiscono gli sbarramenti gastrico, intestinale ed epatico. Oltre a stomaco, fegato e intestino, almeno per quanto concerne la terapia antimicrobica, un sistema aggiuntivo che può infine limitare l'efficacia biologica è quello, potenzialmente presente, deputato ad estrarre l'agente nocivo dal corpo unicellulare.

Incrementatori (o enhancers) di attività possono essere in definitiva:

1. sostanze capaci di ridurre la quantità di acido cloridrico gastrico prodotto e/o capaci di proteggere la sostanza attiva dall'acido cloridrico (vedi capitolo successivo);
2. analoghi dei sali biliari, surfactanti, acidi grassi e fosfolipidi capaci di ridurre l'idrofobicità di alcune sostanze;
3. polimeri (ad esempio il trimetil-chitosano) capaci di ridurre la forza delle giunzioni serrate attraverso un'interazione diretta con l'F-actina del citoscheletro;
4. chelanti il calcio (come l'EDTA -etilen diamino tetracetato- ad esempio) che attraverso la riduzione della quota di calcio extracellulare "allargano" i contatti cellula-cellula a livello enterocitario;
5. antagonisti della glicoproteina-P;
6. antagonisti dei citocromi.

Enhancer è quindi un concetto piuttosto ampio dove trovano anche spazio eccipienti per la galenica formulativa (sostanze filmanti), sostanze di grado alimentare (lipidi) e tecnica industriale (micronizzazione e nanotecnologie).

I tre ambiti migliorativi che mi preste ad analizzare sono i fitosomi, i bioenhancer erballi e le associazioni tra erballi che producono sinergie'.²⁴

I fitosomi

I fitosomi sono annoverati tra le nuove strategie di formulazione che possono migliorare drasticamente l'efficacia degli integratori a base di principi attivi fitoterapici; nonostante i potenziali benefici ottenibili grazie alla aumentata biodisponibilità fitochimica, è tuttavia necessario porre attenzione al fatto che questo approccio potrebbe aprire il vaso di Pandora dei rischi tossicologici che milioni di anni di evoluzione sono riusciti a tenere chiuso in modo efficace. Ad oggi, nessuna valutazione clinica è stata fatta per confermare potenziali interazioni tra erbe e farmaco di incorporazione.

I fitochimici che fino ad oggi sono stati vittime della difesa umana xenobiotica, potrebbero essere meglio trasportati dal meccanismo di incorporazione.²⁵

La *tecnologia* del *fitosoma* è stata sviluppata negli ultimi vent'anni grazie ai ricercatori italiani che hanno osservato una stretta affinità di legame di certi polifenoli verso i fosfolipidi nei tessuti vegetali originali. I fosfolipidi si caratterizzano per possedere una struttura molecolare solubile sia in acqua che nei lipidi: un fosfolipide molto diffuso in natura e il più importante nell'organismo umano è la fosfatidilcolina, perché è il costituente principale del doppio strato lipidico delle membrane cellulari; dal punto di vista dietetico è la fonte di colina, un rilevante composto della soia ed un ottimo emulsificante a livello biliare.²⁶

Ad ogni complesso, costituito da un principio attivo e da un fosfolipide vettore, è stato dato il nome di *fitosoma*®. Tali prodotti, nati inizialmente con finalità dermatologiche e quindi per applicazioni topiche, costituiscono oggi una delle più significative innovazioni nel settore della fitoterapia: prodotti altamente purificati di cui sono note tutte le proprietà, complessati in maniera da divenire

24 Liberamente tratto dal testo Di Pierro F., Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica (Italian Edition), CEC Editore, Gennaio 2014.

25 Gurley B., "Emerging Technologies for Improving Phytochemical Bioavailability: Benefits and Risks", in Clinical Pharmacology & Therapeutics, June 2011.

26 Campo J., "Proprietà nutraceutiche dei principi attivi naturali: i curcuminoidi", in Tesi di laurea 2012-2013.

altamente biodisponibili ed espletare azione farmacologica evidente anche quando impiegati a basso dosaggio. Effettivamente tutti gli studi eseguiti sui fitosomi, dalle valutazioni farmacologiche a quelle cliniche, hanno evidenziato come attraverso tale vettorizzazione sia possibile rendere biodisponibili prodotti puri non, o scarsamente, biodisponibili o, più semplicemente, incrementare la biodisponibilità di frazioni già in parte biodisponibili, consentendo quindi la riduzione della dose di utilizzo e l'ottenimento di risultati di grande evidenza molto spesso non raggiungibili, impiegando l'estratto di partenza a dosaggi anche superiori.

Nel *fitosoma*® il principio attivo è parte integrante della membrana essendo ancorato attraverso legami chimici deboli, le cosiddette forze di Wan der Walls, alla testa polare dei fosfolipidi con i quali è in rapporto molare 1:1. Il rapporto in peso, all'interno del *fitosoma*®, dei suoi due componenti è invece tipicamente 1:2 (1 parte di attivo, 2 parti di fosfolipide): non è comunque un rapporto assoluto. Nel *fitosoma*® di *curcumina* (polifenolo da *curcuma longa*) il rapporto in peso è 5:1 (in favore del fosfolipide ovviamente); il *fitosoma*® è una entità chimica non riconducibile alla semplice miscelazione dei due ingredienti costitutivi.

La complessazione chimica, debole, non è l'unico fenomeno ad avvenire: nel *fitosoma*® ha luogo, infatti, un'interazione tra il principio attivo e la testa polare del fosfolipide con le due catene alifatiche di quest'ultimo avvolte attorno al principio attivo stesso. Tale disposizione produce un involucro lipofilo che scherma l'attivo stesso e rende il complesso capace di solubilizzarsi in solventi a bassa polarità. Altre caratteristiche di rilievo del *fitosoma*® sono la sua stabilità alle alte temperature (fino a 70°C), in acqua (oltre le 2 ore) e in succo gastrico ed enterico.

Grazie a queste caratteristiche il *fitosoma*® è facilmente formulabile e non richiede manipolazioni galeniche, come ad esempio la gastro-protezione. Sulla base delle sue caratteristiche chimico-fisiche, spettroscopiche e biologiche il *fitosoma*® può essere considerato una nuova entità che sostanzialmente migliora la biodisponibilità orale del principio attivo che trasporta al suo interno. In generale l'uso delle forme fitosomiali consente di migliorare la biodisponibilità orale dei composti e, di conseguenza, la loro efficacia. Questo è tanto vero per composti completamente non biodisponibili (per es. la silibina pura ottenuta da *silybum marianum*), quanto per quelli biodisponibili scarsamente (ad esempio la curcumina da *curcuma longa radice* o gli oligomeri procianidolici da *vitis vinifera* semi) o solo in parte (ad esempio le catechine gallate da foglie di *camellia sinensis*). Complessando quindi un polifenolo con un fosfolipide anfipatico, per ottenere

un fitosoma®, al polifenolo viene ad attribuirsi tale versatilità chimica, in termini di solubilità, tipica del fosfolipide vettore.

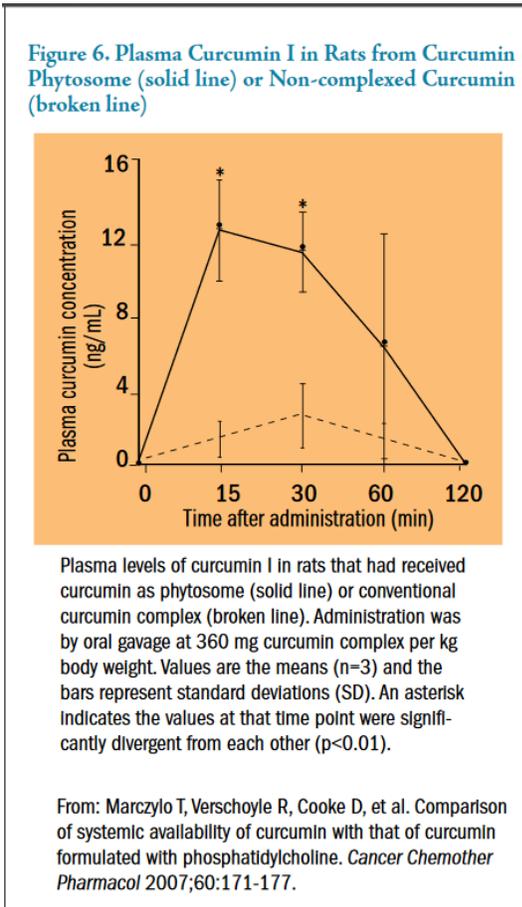
I miglioramenti cinetici riportati in letteratura per la forma *fitosoma*® descrivono incrementi mai inferiori alle tre volte e, in alcuni casi superiori alle 30.²⁷

A questo proposito ho intervistato il responsabile di un laboratorio che produce prodotti fitoterapici in merito ai limiti di utilizzo dei fitosomi su piccola scala, ne ho dedotto che i limiti di utilizzo siano dovuti principalmente a due fattori:

- la materia prima non è di facile lavorazione, tende ad essere appiccicosa e si comprime male negli estratti secchi;
- il costo è molto alto: a parità di prezzo la concentrazione dell'attivo spesso si abbassa molto rispetto alla versione non fitosomale (es: la curcuma si titola al 20% di curcuminoidi nel fitosoma contro il 90% della versione senza fitosomi); ne consegue che gli effetti sulla biodisponibilità non sono sempre apprezzabili a parità di costo.

27 Liberamente tratto dal testo Di Pierro F., Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica (Italian Edition), CEC Editore, Gennaio 2014.

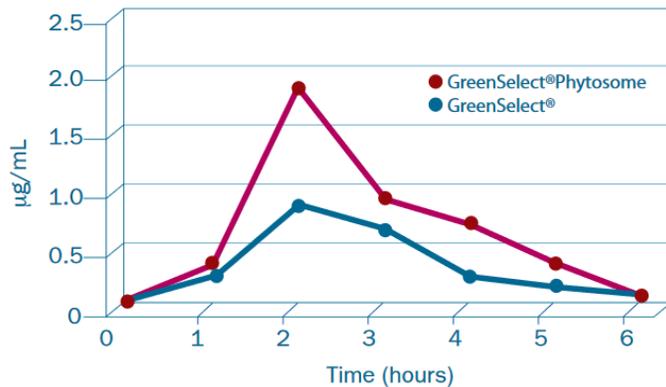
Vediamo ora in maggiore dettaglio le forme fitosomiali delle sostanze selezionate:



La biodisponibilità del preparato di **fitosoma** di **curcumina** (Meriva®, di Indena SpA) è stata testata nei ratti verso l'estratto di curcumina non fitosoma equivalente di Indena. I ratti sono stati a digiuno durante la notte, quindi hanno ricevuto per via orale preparazione fitosomica o non fitosomica, i campioni di sangue sono stati ottenuti a 15, 30, 60 o 120 minuti dopo l'assunzione orale, il complesso di curcumina è stato somministrato per via orale a 360 mg / kg di peso corporeo, in forma di fitosoma o non fitosoma. I valori sono le medie (n = 3) e le barre rappresentano le deviazioni standard (SD). Un asterisco indica che i valori in quel momento erano significativamente divergenti l'uno dall'altro (p <0,01). La *curcumina* I è stata identificata nei campioni di sangue di ratto insieme ai suoi metaboliti curcumina glucuro-nide, curcumina solfato, tetraidrocurcumina ed hexa-idrocurcumina. La preparazione del fitosoma ha mostrato un assorbimento

plasmatico di curcumina superiore dai primi 30 minuti. Come mostrato qualitativamente nella fig.0-5, per il periodo di 0-120 minuti i valori di AUC (area under the curve) sono circa 5 volte superiori per il fitosoma di curcumina rispetto alla preparazione non fitosomiale (dati effettivi 26,7 mcg / min / mL contro 4,8 mcg / min / mL). In questo studio, il fegato ha anche accumulato una quantità significativamente maggiore di curcumina I dal fitosoma rispetto al non fitosoma. I problemi primari che limitano la biodisponibilità del complesso di curcumina convenzionale sono la scarsa solubilità in acqua, l'instabilità molecolare tra cui una rapida degradazione idro-litica e una rapida modificazione molecolare per coniugazione, principalmente nel fegato, alle forme di glucuronide e solfato che vengono rapidamente escrete. Questi hanno una bioattività sconosciuta e difficilmente attraversano la barriera emato-encefalica. La conversione delle curcumine in fitosomi affronta questi problemi.

Per quanto concerne invece la forma **fitosoma**® ottenuta complessando le catechine gallate della

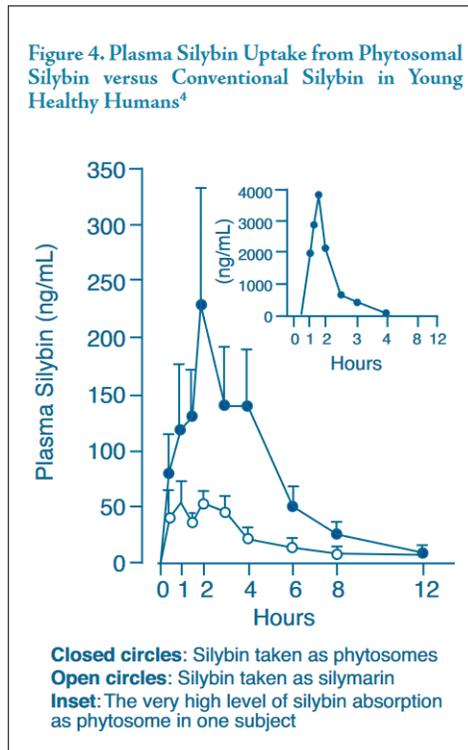


From: Pietta PG, Simonetti P, Gardana C, et al. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochem Mol Biol Int* 1998;46:895-903.

camellia sinensis (tè verde) con i fosfolipidi, i vantaggi cinetici risultano essere circa tre volte maggiori se si confrontano i rilievi cinetici ottenuti somministrando la stessa quantità di catechine gallate in forma libera. Nel 1998 Pietta e collaboratori hanno confrontato l'assorbimento di un estratto standardizzato e decaffeinato di GTC (da Indena SpA3) con lo stesso estratto in

forma di fitosoma, in 12 soggetti volontari sani. Ogni soggetto ha ricevuto una singola dose da 400 mg di GTC, in entrambi i casi non complessati, o forma di phy-tosome, sono stati poi misurati i livelli ematici di EGCG. Come mostrato nella fig.0-6, durante il periodo di studio di sei ore, la concentrazione plasmatica di picco di EGCG dal fitosoma (circa 4,0 micromolari) è stata doppia rispetto all'estratto non fitosomico (circa 2,0 micromolari). Un supplemento di fitosoma che fornisce più di 400 mg GTC / die potrebbe essere una dose abbastanza elevata da bloccare l'angiogenesi e / o l'aterosclerosi; in questo studio la singola dose da 400 mg di GTC ha anche migliorato la sua capacità antiossidante. Misurato come parametro anti-ossidante totale (TRAP), il fitosoma ha dimostrato un effetto antiossidante maggiore del 20% rispetto alla forma non fitosomiale. In uno studio a lungo termine, 105 soggetti volontari sani hanno ricevuto 135 mg totali GTC ogni giorno per due settimane, sia come preparazione GTC convenzionale, decaffeinata che come suo derivato fitosomico. La forma non fitosomica ha leggermente, ma non significativamente, elevato contenuto di vitamina E della membrana dei globuli rossi (RBC) e non è riuscita a modificare il livello di acido grasso polinsaturo di membrana (PUFA), un fattore predittivo della fluidità della membrana. Al contrario, il fitosoma GTC ha aumentato significativamente i livelli di vitamina E e PUFA; questi effetti tendono a rendere la membrana dei globuli rossi più fluida e più resistente ai danni ossidativi: l'effetto membrana del fitosoma GTC ha importanti implicazioni, considerando che le membrane cellulari sono fondamentali per i processi vitali.

La farmacocinetica umana e animale del *complesso fitosomico* di *silibina* è stata rivista in modo approfondito. Per quanto riguarda la biodisponibilità, è questo l'aspetto delle preparazioni



fitosomiche esistenti più accuratamente studiate; a parità di quantità di silibina assunta per via orale, la forma fitosomica raggiunge livelli plasmatici di silibina notevolmente più elevati rispetto alla forma convenzionale. L'assunzione comparativa di silibina dalla forma fitosomica rispetto alla forma non fitosomica è stata affrontata in due studi sul soggetto umano. Nel primo, i giovani soggetti sani (età 16-26, n = 8) hanno assunto singole dosi di 360 mg di silibina per via orale, sia come fitosoma che come silibina convenzionale. Dopo otto ore, il livello di silibina plasmatica ottenuto dal fitosoma era quasi tre volte quella della silibina non complessata. Misurando l'area totale sotto la curva (AUC) è stato determinato che la silibina viene assorbita dal fitosoma 4,6 volte meglio rispetto alla sua

forma convenzionale. Il secondo studio di farmacocinetica umana è stato condotto sugli stessi giovani volontari sani: rispetto a una singola dose di 360 mg, la dose di silibina è stata di 240 mg, due volte al giorno (120 mg ogni 12 ore) per otto giorni; questo modello di assunzione giornaliera ha raggiunto elevate concentrazioni plasmatiche e un assorbimento totale nell'ottavo giorno. Inoltre, la capacità di portare silibina nella circolazione è migliorata, il fitosoma, infatti, porta più facilmente la silibina al fegato; ciò è stato dimostrato dalla raccolta della bile secreta dal fegato di 9 pazienti precedentemente sottoposti a rimozione chirurgica della cistifellea (necessaria in caso di calcoli biliari). Dopo la somministrazione di singole dosi orali di 120 mg di silibina, sia come fitosoma di silybin che di silimarina convenzionale, la bile raccolta in 48 ore conteneva l'11% della dose totale di silibina dalla forma fitosomica, rispetto al 3% dalla fonte di silibina non complessata. In questo studio il livello plasmatico di silibina derivante dalla somministrazione convenzionale di silimarina era quasi impercettibile, suggerendo che una dose orale di 120 mg di silibina potrebbe non essere clinicamente efficace. La silibina raccolta nella bile è una misura valida della quantità di sostanza che ha attraversato il tessuto epatico. Di conseguenza questi dati suggeriscono che il fegato umano riceve una quantità di silibina 4 volte superiore se proveniente

dai fitosomi rispetto alla silimarina non complessata. I dati sulla clearance della bile sono anche coerenti con la biodisponibilità plasmatica di 4.6 volte maggiore della silibina dall'assorbimento intestinale.

La forma fitosomiale del **resveratrolo** (RV) ha dimostrato un incremento del'AUC. Il RV viene glucuronidato da MRP2 e da BCRP (ATP binding cassette) già in sede intestinale. La forma fitosoma scavalca l'intestino veicolando il RV all'interno dei chilomicroni grazie all'azione micellante degli acidi colici, limitando quindi un processo massivo di glucuronidazione intestinale.

28

Sostanze bioenhancer erbali

In questa sezione mi sono concentrata su quelle sostanze di derivazione erbale capaci di incrementare la biodisponibilità di altre sostanze fitoterapiche, o di farmaci, caratterizzate al contrario da uno scarso profilo di assorbimento orale, e/o comunque, da scarsa efficacia legata a problematiche anche diverse dai semplici aspetti di farmacocinetica che descrivono l'arrivo nella circolazione plasmatica di una qualunque sostanza dopo la somministrazione orale.

In particolare, ho analizzato gli *herbal bioenhancer* che sono stati studiati per valutare l'aumento della biodisponibilità di silimarina, curcumina, catechine e resveratrolo.

‘Gli herbal bioenhancer veri e propri non sono sostanze particolarmente capaci di condizionare l'assorbimento di un principio attivo erbale, attraverso un'interazione con il film acquoso intestinale o con le giunzioni serrate (fa eccezione a questa regola, come vedremo in seguito, lo zenzero). Il ruolo di herbal bioenhancer si gioca infine, almeno in maniera preferenziale, soprattutto a livello di ATP-binding cassette, in particolare attraverso un antagonismo diretto sulla glicoproteina-P, e a livello di citocromi, principalmente interagendo con gli enzimi di Fase II e, sicuramente meno, con gli enzimi di Fase I.

Da non trascurare poi il fatto che, da un punto di vista teorico, l'herbal bioenhancer è una sostanza inerte; non sempre però le sostanze investigate fino ad oggi per questa funzione sono realmente inerti; possiamo però attribuire loro una certa inerzia farmacologica, almeno per ciò che concerne

28 Kidd P.M., "Bioavailability and Activity of Phytosome Complexes from Botanical Polyphenols: The Silymarin, Curcumin, Green Tea, and Grape Seed Extracts", in *Alternative Medicine Review* Volume 14, Number 3, 2009.

il target farmacologico cercato. Quella che segue è quindi una disamina, attenta per quanto possibile, dei principali herbal bioenhancer, da qui in avanti semplicemente HB, noti ad oggi.

Se un composto è assorbito al 10% quando somministrato da solo, o al 14% se somministrato insieme alla piperina, avrà maggiori possibilità di influenzare gli aspetti clinici del trattamento. In questo caso, infatti, la biodisponibilità orale del farmaco risulta incrementata del 40%. Questo spiega anche perché i migliori risultati derivanti dal co-trattamento con piperina si ottengono somministrando derivati erbali, e non farmaci, molti di questi, gli erbali, sono infatti assorbiti per valori inferiori all'1%; divenire assorbiti di 2-3 o più punti percentuali vuol dire modificare la cinetica anche del 400%, incidendo, in questo caso, in maniera importante sul risvolto clinico.²⁹

‘La **piperina** è un alcaloide presente sia nel *piper nigrum* (pepe nero) che nel *piper longum* (pepe lungo); nel pepe nero è presente per valori che vanno dal 5 al 9% circa. Nonostante siano numerosi i meccanismi d'azione chiamati in causa per spiegare l'evidente ruolo di HB della piperina(7,8), oggi si ritiene che almeno gran parte di tale proprietà sia dovuta ad una capacità di inibizione di quegli enzimi, intestinali ed epatici, preposti alla biotrasformazione e alla eliminazione dei farmaci noti come citocromi, o enzimi di Fase I e Fase II, con particolare efficacia giocata sugli enzimi deputati agli aspetti di coniugazione, finalizzati all'eliminazione urinaria (enzimi di Fase II), anche se la capacità di comportarsi come HB è in stretta dipendenza della molecola di cui l'azione viene incrementata, valori compresi tra l'1 e il 10%'.³⁰

Per la piperina le dosi più comunemente impiegate vanno dai 4 ai 20 mg/dose. Queste possono essere considerate sicure in relazione alla DL50 della piperina quando misurata nel topo (330 mg/kg) e nel ratto (514 mg/kg), circa 40.000 volte superiori a quelle impiegate per ottenerne il ruolo di HB. Ovviamente l'incremento in termini di biodisponibilità orale è direttamente proporzionale al gap esistente tra la biodisponibilità reale e quella auspicabile, quest'ultima idealmente del 100% (dove per 100% non si intende la dose somministrata per bocca, ma la quota reperibile nel sangue dopo somministrazione endovenosa). Se un farmaco è assorbito per valori superiori al 95%, difficilmente la piperina sarà in grado di determinare incrementi farmacocinetici con effetti clinici misurabili. È logico infatti ipotizzare per la piperina la capacità di incremento

29 Liberamente tratto dal testo Di Pierro F., Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica (Italian Edition), CEC Editore, Gennaio 2014.

30 Liberamente tratto dal testo Di Pierro F., Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica (Italian Edition), CEC Editore, Gennaio 2014.

cinetico di un farmaco solo di alcuni punti percentuali (inferiori comunque a 5). Incrementare, tramite la somministrazione di piperina, di 2-3 punti percentuali la biodisponibilità orale di un composto assorbito, rispetto alla somministrazione endovenosa, per valori ad esempio intorno all'85%, difficilmente cambierà il risultato clinico di un trattamento eseguito col solo farmaco. Differentemente, un composto assorbito al 10%, quando somministrato da solo, o al 14% se somministrato insieme alla piperina, avrà maggiori possibilità di influenzare gli aspetti clinici del trattamento. In questo caso, infatti, la biodisponibilità orale del farmaco risulta incrementata del 40%. Questo spiega anche perché i migliori risultati derivanti dal co-trattamento con piperina si ottengono somministrando derivati erbali, e non farmaci; molti di questi (gli erbali) sono infatti assorbiti per valori inferiori all'1%. Divenire assorbiti di 2-3 o più punti percentuali vuol dire modificare la cinetica anche del 400% incidendo, in questo caso, in maniera importante sul risvolto clinico.

Detto questo appare chiaro come la piperina possa intervenire in maniera importante sugli aspetti cinetici di pochi farmaci: lo sfruttamento di tale capacità determina comunque, anche se su un numero ridotto di classi di composti, notevoli vantaggi in termini di efficacia, tossicità e costi.

Con lo stesso meccanismo d'azione riportiamo quanto segue:

- Naringin è un inibitore del CYP3A4, è il principale glicoside flavonoide, si trova nel pompelmo, mele e cipolle, dovuto alla sua capacità di inibire il CYP3A4 intestinale e P-gp.
- Acido gallico è ininibitore di CYP3A4.
- Sinomenine, un monoterpene alcaloide glucosio estratto da *sinomenium acutum*, noto per essere una P-gp inibitore.
- Genisteina, un isoflavone trovato in un numero di piante dietetiche come la soia (*glycine max*) e kudzu (*pueraria lobata*), noto per essere un inibitore della P-gp [40,61].
- Carum carvi: *carum carvi* (famiglia - Apiaceae) chiamato anche *cumino* / *cumino carvone* come suo principale costituente che è ottenuto dall'essiccato e schiacciato seme. Il suo modo di agire è quello di inibire la pompa di efflusso di P-gp.

Lo **zenzero** contiene numerosi componenti, quelli più numerosi sono i gingeroli che possono essere convertiti in shogaols, zingerone e paradol. Questi composti, insieme ai componenti di olio volatile,

hanno effetti forti su membrana mucosa del tratto gastrointestinale con conseguente regolazione della funzione intestinale per facilitare l'assorbimento.

Lo zenzero viene utilizzato nell'intervallo di 10-30 mg / kg di corpo peso come bioenhancer.

Altri bioenhancer a base di erbe con azione sul tratto gastrointestinale, la membrana simile all'effetto dello zenzero include:

- estratto di *aloe vera*: il gel e la foglia intera estratti di aloe vera hanno dimostrato di migliorare l'orale assorbimento di vitamina C e vitamina E. Dall'osservazione del meccanismo d'azione del bioenhancing si pensa che questi prodotti siano attribuiti ai loro componenti polisaccaridi. Polisaccaridi di origine naturale, come il chitosano, agiscono come stimolatori della penetrazione, attraverso un processo di apertura transitoria delle giunzioni strette tra adiacenti cellule epiteliali, pertanto, sono in grado di migliorare l'assorbimento intestinale di farmaci somministrati contemporaneamente.
- Liquirizia è il nome dato a la radice della pianta *glycyrrhiza glabra*. L'estratto di questa pianta contiene un fito-costituente, glicirrizina, che è ritenuto un bioenhancer. Si stima che il miglioramento dell'assorbimento del tratto gastrointestinale sia da 2 a 6 volte. Strutturalmente, la glicirrizina è una saponina e le saponine hanno proprietà tensioattive che possono agire sulla via paracellulare, l'effetto di miglioramento dell'assorbimento della glicirrizina è ulteriormente migliorato in presenza di altri bioenhancer.³¹

Sulla base di quanto riportato, riguardo ai meccanismi di azione degli herbal bioenhancer, si può supporre che la piperina possa migliorare la biodisponibilità del resveratrolo in quanto agisce sugli enzimi di Fase II che coniugano il resveratrolo: ci si aspetta che la quota di RV libero aumenti se co-somministrato con piperina; Johnson JJ, et al., (2011) hanno esaminato l'effetto della piperina (10 mg / kg) sui parametri farmacocinetici del resveratrolo (100 mg / kg) nei topi. I livelli sierici di resveratrolo e resveratrolo-3-O- β -D-glucuronide sono stati analizzati in momenti diversi e hanno scoperto che l'AUC del resveratrolo è stata aumentata al 229% e la concentrazione sierica massima (Cmax) è stata aumentata al 1544% con l'aggiunta di piperina. Shoba G, et al., (1998) hanno studiato l'effetto della piperina sulla biodisponibilità della curcumina nei ratti e nei soggetti volontari sani alla dose di 20 mg / kg e 20 mg e 2 g / kg nei ratti e 2 g

31 AAVV, Appraisal of Bioenhancers in Improving Oral Bioavailability: Applications to Herbal Medicinal Products", in Journal of Pharmaceutical Research International 2018.

rispettivamente. La somministrazione concomitante di piperina aumenta la tmax, mentre l'emivita di eliminazione e la clearance sono significativamente diminuite; la biodisponibilità è stata aumentata del 154%. D'altra parte, nell'uomo, l'aumento della biodisponibilità è stato del 2000%: lo studio dimostra che la piperina migliora la concentrazione sierica, l'entità dell'assorbimento e la biodisponibilità della curcumina, sia nei ratti che nell'uomo, senza effetti avversi.³²

Quando la **silibina** e la **piperina** sono state somministrate in **concomitanza**, la massima concentrazione plasmatica del farmaco (Cmax) e l'area sotto la concentrazione del farmaco fino al tempo 't' AUC (0-t), sia della silibina A che della silibina B, nei ratti erano superiori a quello della silibina usata da sola. Sono stati osservati sia l'aumento del 76% di Cmax che l'aumento del 37% di AUC (0-t) di silibina A, mentre i valori di Cmax e AUC 0-t di silibina totale B sono stati aumentati rispettivamente del 60% e del 26%. Anche le concentrazioni di silibina libera A e silibina B sono state aumentate dalla piperina su una scala simile. In questo studio abbiamo dimostrato per la prima volta che la piperina, come bioenhancer, ha aumentato la biodisponibilità della silibina (146% - 181%), contribuendo a un effetto terapeutico, potenziato, nel modello di ratto, di danno epatico acuto indotto da CCl4. I meccanismi sottostanti prevedevano che la piperina aumentasse l'assorbimento della silibina, inibendo i trasportatori di efflusso; la piperina, inoltre, potrebbe inibire l'escrezione biliare di silibina e metaboliti coniugati negli epatociti di ratto coltivati a sandwich. In particolare, abbiamo scoperto che la piperina non ha influenzato il metabolismo di Fase 2 della silibina. Le pompe di efflusso svolgono un ruolo importante nel comportamento farmacocinetico dei flavolignani e la modulazione di questi trasportatori, mediante bioenhancer come la piperina, potrebbe migliorare l'assorbimento in vivo della silibina, portando a trattamenti più efficaci.³³

La biodisponibilità assoluta di **EGCG** dopo la somministrazione orale nei ratti è risultata dello 0,1%.

32 AAVV, "Bioavailability Enhancement by Piperine: A Review", in Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 2014.

33 AAVV, "Piperine enhances the bioavailability of silybin via inhibition of efflux transporters BCRP and MRP2", in Phytomedicine, 2019.

La **curcumina**, ottenuta dalla *curcuma longa*, viene utilizzata come **bio-potenziatore** per agenti antimicrobici e farmaci antitumorali. Presenta forti proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antimutagene e anticancerogene. La curcumina può recuperare lo stress ossidativo indotto chimicamente, nonché aumentare l'attività degli enzimi disintossicanti xenobiotici, sia nel fegato che nei reni, e sopprimere la perossidazione lipidica. La curcumina ha una bassa solubilità e una bassa permeabilità dall'intestino, a causa della pompa della glicoproteina P (P-gp).

La curcumina agisce secondo due meccanismi: la soppressione degli enzimi che metabolizzano i farmaci nel fegato e l'induzione a cambiamenti nel trasportatore di farmaci P-gp; viene inizialmente assorbita dall'intestino, all'interno del quale viene nuovamente effluita dalla P-gp. La curcumina, come l'EGCG, viene eliminata dalla P-gp, quindi può svolgere un ruolo fondamentale nell'inibire la P-gp, migliorando così la permeazione dell'EGCG, inibendo il suo efflusso.³⁴

Sinergie ottenute attraverso la combinazione di erballi

I polifenoli possono avere una scarsa biodisponibilità quando somministrati da soli. Tuttavia, la biodisponibilità e le molteplici proprietà preventive di questi nutrienti possono essere migliorate se somministrate in combinazione con altri polifenoli, sostanze fitochimiche e farmaci antitumorali. Pertanto, i futuri indirizzi della ricerca possono potenzialmente espandersi sull'uso di polifenoli a base alimentare, specialmente in combinazioni, come metodo potente ed efficace nella prevenzione e terapia del cancro. Le terapie tradizionali, come la chemioterapia e la radioterapia, hanno notevoli effetti collaterali: è indispensabile sviluppare nuovi approcci che abbiano meno effetti secondari e siano più sicuri. Numerosi studi clinici e in vivo hanno dimostrato l'efficacia dell'uso in sicurezza di polifenoli a base dietetica nella prevenzione del cancro e nelle misure terapeutiche contro meccanismi molecolari e modifiche epigenetiche.

I polifenoli possono avere una scarsa biodisponibilità quando somministrati da soli: vari studi hanno dimostrato una forte evidenza di effetti combinatori di diversi polifenoli che hanno aumentato le proprietà chemioprotettive e anticancro, a concentrazioni considerevolmente inferiori rispetto a quelle necessarie se somministrati da soli. Questa sinergia di polifenoli in alcuni casi è

34 AAVV, "Effect of genistein on the bioavailability and intestinal cancer chemopreventive activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate", in *Carcinogenesis* vol.29 no.10 pp.2019–2024, 2008.

dovuta all'impatto simultaneo su diverse vie tumorali, nonché a modifiche epigenetiche come la metilazione del DNA.

L'uso di flavonoidi in combinazione sinergica, quando è presente l'intero team di antiossidanti, porta a numerosi benefici fisiologici. Ne consegue che gli approcci combinatori possono essere potenzialmente utilizzati nella prevenzione e nella terapia del cancro: possono essere il risultato della combinazione di un polifenolo con due o più polifenoli, una combinazione di polifenoli con farmaci anticancro, con vitamine e integratori. Questi approcci possono facilitare l'inibizione dello sviluppo del tumore e in alcuni casi i composti combinati possono agire sinergicamente. In questa sede forniamo dettagliate informazioni sui vari approcci combinatori di gruppi differenti incentrati su diversi tipi di cancro.³⁵

Questi sono riassunti nella fig.0.8 che mostra la quantità, espressa in micromoli, (colonna "Dose") di principio attivo necessaria per singola sostanza per avere l'effetto indicato in colonna. La tabella mostra quantitativi relativi bassi se confrontati con le dosi della sostanza presa singolarmente in fig. 0-9.

Curcumina e catechine

Uno studio è stato condotto in vivo sui ratti con la 1, 2-dimetilidrazina (DMH) per l'induzione dei tumori del colon-retto e ha dimostrato l'effetto combinatorio sulla curcumina e sulle catechine. Il trattamento con curcumina, catechine, anche in combinazione è stato effettuato nei gruppi positivi e trattati di conseguenza; sebbene l'incidenza del tumore a danno del colon-retto fosse inferiore nelle catechine e nei gruppi di trattamento con curcumina, la differenza non era significativa rispetto ai gruppi di trattamento in cui le catechine e la curcumina venivano somministrate da sole. La frequenza del tumore del colon-retto è risultata significativamente più bassa nel gruppo di combinazione rispetto ai gruppi positivi. Lo studio ha anche dimostrato che l'indice di proliferazione cellulare (PI) è stato inibito in modo più rilevante nel gruppo di combinazione (indice PI: 24,2 9,02, p <0,01) rispetto alla curcumina (indice PI: 39,2 7,26, p <0,05) e catechina (PI indice: 36,8 5,50, p <0,05) somministrate da sole.

Un altro studio sul carcinoma mammario (cellule MCF-7 e Sum149) ha dimostrato un miglioramento della biodisponibilità di curcumina e piperina in combinazione. Sia la curcumina

35 AAVV, "Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy", in Journal of Molecular Science, 14 September 2019.

che la piperina hanno avuto un effetto inibitorio ma l'effetto è stato maggiore quando entrambi i polifenoli erano combinati.³⁶

Table 3. Impact of combinatorial therapy (polyphenols, phytochemicals, and anti-cancer drugs) on epigenetic modifications and molecular mechanisms (in vitro studies) in cancer.

Curcumin + Resveratrol	Prostate cancer	PTEN-CaP8 cancer cells		B6C3F1/J mice		↓ p-Akt, and cyclin D1 activity
Curcumin + Catechins	Colon cancer			DMH rat model	0.1% + 0.1%	↑ Apoptotic index ↓ Proliferation index
Curcumin + Piperine	Breast cancer	MCF-7 and Sum159 cells	5-25 μM + 5-25 μM			Inhibit mammosphere formation ↓ stem cell self-renewal ↓ in the cell percentage expressing stem cell marker ALDH1 Inhibit Wnt Signaling
Curcumin + Arctigenin + Green tea + Epigallocatechin gallate (EGCG)	Prostate cancer	LNCaP cells	5-10 μM + 1 μM + 40 μM			↑ Apoptosis ↑ Cell cycle arrest at G0/G1 phase ↓ Activation of <i>NFκB</i> , <i>PI3K/Akt</i> and <i>Stat3</i> pathways ↓ Cell migration
	Breast cancer	MCF-7 cells	5-10 μM + 1 μM + 40 μM			↓ Tumor size Cell cycle arrest at G1 and S/G2 phase Inhibition of expression of cyclin B1 and cyclin D1 Inhibition of clonal formation Down-regulation of DNMTs
Curcumin + Epigallocatechin gallate (EGCG)	Non-small lung cancer	A549 and NCI-H460 cells	10 μmol/L + 10 μmol/L			↑ p21 expression Cell cycle arrest at S, G2/M phase
	Prostate cancer	LNCaP, DU145 and PC3 cells	50 μM + 100 μM			
Genistein + Resveratrol	Prostate cancer			Rats	83 mg/kg + 83 mg/kg	↓ Tumor growth Inhibition of Growth factors
Genistein + EGCG + quercetin	Prostate cancer	CWR22Rv1 cells	2.5 μM + 2.5 μM + 2.5 μM			↑ p53 activity ↓ cell proliferation
Resveratrol + Thymoquinone	Breast cancer	MCF-7 and T47D cells	10 μM + 25-300 μM	Balb/C mice	50 mg/kg + 50 mg/kg per day	↑ Apoptosis, ↓ Tumor growth Inhibition of angiogenesis
Resveratrol + Quercetin	Prostate cancer	22Rv1, DU145 and PC3 cells		TRAMP mice model	625 mg/kg + 60 mg/kg	↓ Cell proliferation
Resveratrol + Curcumin + ADR	Ovarian cancer	A2780 cells	10 μM + 2 μM + 1 μM	Xenograft model in Athymic mice	19.68 mg/kg + 26.06 mg/kg + 5mg/kg	↓ Cell viability ↓ Tumor size ↑ Apoptosis
Resveratrol + Quercetin + ADR	Ovarian cancer	A2780 cells	10 μM + 10 μM + 1 μM	Xenograft model in Athymic mice	19.68 mg/kg + 5.2 mg/kg + 5mg/kg	↓ Cell viability ↓ Tumor size ↑ Apoptosis
Resveratrol + Doxorubicin	Gastric cancer	SGC7901 and MGC803 cell lines	50 mg/L + 0.75 mg/L	Nude xenograft mice model	3 mg/kg + 50 mg/kg [§]	↑ expression of caspase 9 ↑ PTEN, TSC1, TSC2, and cleaved caspase 3 ↓ p-Akt, and mTOR activity
Resveratrol + Genistein + Quercetin + Apigenin + Baicalein + Curcumin + EGCG	Prostate cancer	PC3 and LNCaP cells		TRAMP mice model	1 μmol/L + 20 μmol/L + 10 μmol/L + 3 μmol/L + 3 μmol/L + 10 μmol/L + 10 μmol/L	↓ Gli1 mRNA activity ↓ Tumor size
Resveratrol + Pomegranate + Orange + Lemon + Olive + Cocoa + Grape seed	Breast Cancer	MCF-7 cells			53.85 mg + 161.5 mg + 53.85mg + 53.85 mg + 161.5 mg + 161.5 mg + 53.85 mg	↓ Anti-proliferative activity ↓ Estrogenic estrogenic/anti-estrogenic activity
Resveratrol + Quercetin + Catechin + Gefitinib	Breast cancer	MDA-MB-231 cells	15 μM + 15 μM + 15 μM + 15 μM	SCID mice model	5 mg/kg + 5 mg/kg + 5 mg/kg + 200 mg/kg	↓ Tumor size Cell cycle arrest at S phase ↓ Cell viability Inhibition of Akt/mTOR signaling

FIGURA 0-8

36 AAVV, "Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy", in Journal of Molecular Science, 14 September 2019.

Table 2. Assessment of polyphenols and their associated epigenetics modifications and molecular mechanisms (in vivo and in vitro studies) in cancer

Dietary Compounds	Epigenetic Modifications	Gene Targets	* Overall Role in Cancer Progression	Dose	In Vitro Model	In Vivo Model
Apigenin	DNMT1 inhibitor DNMT3a inhibitor DNMT3b inhibitor HDAC1 inhibitor HDAC3 inhibitor	<i>NFE2L, NQO1, Nr2, GRP78, GADD153, p21, waf1, and hTERT p53</i>	↓ Viability ↓ GLI1 expression Cell cycle arrest ↑ Apoptosis ↑ Caspase 3 Activity	20–30 μM 40–160 μM 20–50 μM 20–100 μM 20–40 μM	Pancreatic cancer Lung cancer (H460 cells) Breast cancer (BT-474 cells) Skin cancer (JB6 P+ cells) Prostate cancer (PC-3, 22Rv1 cells)	Mouse
	DNMT inhibitor HAT inhibitor HDAC1 inhibitor Down-regulation of histone methylation	<i>CDKN2B, NEUROG1, NFE2L2, Nr2, Neurog1 RASSF1A, p16, SPARC, SOCS1, SOCS3, p53, p21, GAS5, HOTAIR, H19, AF086415, AK095147, RP1-1791.6.3, MUDENG, AK056098, AK294004</i>	↓ Proliferation ↑ Apoptosis ↓ ERK, MKK4, JNK activity ↓ Bcl-2 ↓ Akt expression ↑ p38 activation ↓ Cell viability ↑ Bax Activity	40 μM 0–100 μM 0–50 μM 2.5–160 μM 7.5–10 μM 0–50 μM	Breast cancer (MCF-7 cells) Prostate cancer (LnCap cells) Colorectal cancer (HCT116, HT29 and RKO cell lines) Gastric cancer (MiaPaCa-2, PANC-1 cells) Breast cancer (MCF-7 cells) Ovarian cancer (SKOV3 cells)	
Ellagic Acid	DNMT1 inhibitor DNMT3b inhibitor HDAC inhibitor	<i>p16INK4a, RASSF1A, GSTP1, HIN1, VEGF, MMP-2, p53</i>	↑ Apoptosis Cell proliferation Cell migration ↑ Caspase 3 Activity ↑ Caspase 9 Activity	50–200 μM 10–100 μM	Colorectal cancer Prostate cancer (PC-3 cells) Breast cancer (MCF-7 cells)	
	DNMT inhibitor HAT inhibitor Down-regulation of histone methylation Effect on histone ubiquitination Upregulation of histone phosphorylation	<i>p16INK4a; RARβ; MGMT; hMLH1; GSTP1; WIF-1; RECK, Cip1/p21 AT102202, p53, p21</i>	↓ Invasiveness ↓ Proliferation ↑ Apoptosis ↑ Caspase 3 Activity ↑ Caspase 8 Activity ↑ Cytochrome c	1–40 μM 1–50 μM 5–20 μM 20–100 μM 1–50 μM 0–20 μg/mL	Breast cancer (MCF-7 cells) Colorectal cancer (HT-29 cells) Lung cancer (CL1-5 cells) Gastric cancer (MKN-1, MKN-28, MKN-45, NUGC-3 and TMK-1) Colorectal cancer Skin cancer (A431 cells)	Xenograft mice
Hesperidin	DNMT inhibitor HDAC inhibitor	<i>GSTP1, Akt, LAMTOR2, LAMTOR3, LAMTOR5, MAPK1, KRAS, HRAS, MAPK3</i>	↓ Cell proliferation ↑ Apoptosis ↑ Glucose uptake ↑ ASK1/JNK pathway ↑ ROS production	40–90 μM 40–200 μM 650 μM 20–50 μM 90 μM 50 μM	breast cancer (MCF-7, MDA-MB-231 cells) Liver cancer Cervical cancer (SiHa cells) Esophageal cancer Prostate cancer (PC-3 cells) Endometrial carcinoma (ECC-1 cells)	Xenograft mice Rats
	DNMT1 inhibitor DNMT3a inhibitor DNMT3b inhibitor HDAC inhibitor HAT activator Decreased SIRT activity Upregulation of histone methylation	<i>p16INK4a; RAR β; MGMT; PTEN; CYLD, MGMT, CDKN2A, BTG3, TERT, GSTP1, EZH 2, FoxM1, sFRP1, p21, p16, PTEN, CCLD, p53, FOXA3, SIRT1, BTG3, hTERT, RAR, HOTAIR</i>	↓ Proliferation ↓ Tumorigenesis ↑ Apoptosis ↑ mRNA expression of tumor suppressor genes ↑ H2A variant at serine 139 (γ-H2AX)	25–75 μM 0.5–50 μM 100 μM 0.5–50 μM 100 μM 20–50 μmol/L 5–100 μM	Lung cancer (H446 cells) Breast cancer (MCF-7, MDA-MB-231 cell lines) Prostate cancer (LAPC-4 cells) Cervical cancer Esophageal squamous cell carcinoma Prostate, breast cancer and renal cancer	Agouti mice Sprague-Dawley rats
Gallic Acid	DNMT1 inhibitor DNMT3b inhibitor	<i>MMP-2, MMP-9, ADAM17, Erk/p-Erk, p-Akt</i>	↑ Apoptosis	200 μM 80.5 μM 25–200 μM 0–40 μg/mL 50 μM	Colorectal cancer Breast cancer (MCF-7 cells) Prostate cancer (PC-3 cells) Cervical cancer (HeLa and HTB-35 cells) Oral cancer (H1299 cells)	
	DNMT1 inhibitor DNMT3a inhibitor DNMT3b inhibitor HDAC1 inhibitor	<i>ATF3, PARP, p38, MMP-9, ERK, Akt</i>	↑ Apoptosis Cell cycle arrest ↓ Cell growth ↓ Cell proliferation	100 μM 20–80 μM 20 or 50 μmol/L 25–200 μM 50–100 μM	Lung cancer (A549 cells) Gastric cancer Esophageal cancer (KYSE-510 cells) Liver cancer (HepG2, Huh-7, and HA22T cells) Colorectal cancer (HCT116, SW480, Lovo, and HT-29 cells)	Resection mice Rats
Piceatannol	DNMT3a inhibitor Decreased SIRT1 activity	<i>RASSF1A, GSTP1, HIN1 mTOR</i>	↑ Apoptosis Cell cycle arrest	30 μM 25 μM 50 μM	Colorectal cancer (HCT116 and HT29 cells) Prostate cancer (DU145 and PC-3 cells) Breast cancer (MCF-7 cells)	Mice
Quercetin	DNMT1 inhibitor HDAC inhibitor Down-regulation of histone demethylation	<i>CDKN2A (p16INK4a), AMPK, Akt, DBH-AS1, p53</i>	↓ Proliferation ↓ Akt phosphorylation ↓ Angiogenesis ↑ Caspase 3 and 7 activity ↑ Bax Activity	1–200 μM 40–160 μM	Liver cancer (HepG2 and SMCC-7721 cells) Lung cancer (A549 cells) Gastric cancer (AGS and MKN28 cells) Colon cancer (HCT116 cells)	Mice
	DNMT3a inhibitor DNMT3b inhibitor Decreased SIRT1, SIRT2, and SIRT3 activity HAT inhibitor Regulation of histone phosphorylation	<i>PTEN, XRCC1, p21 p16, MDR1, SP-1, STIM1, FOXO, PCGEM1, PRNCR1, PCAT29, AK001796, MALAT1, u-Elenor, LINC00978, p53, p21</i>	↓ Proliferation ↓ Metastasis ↑ Apoptosis ↑ Caspase 8/9 activity ↑ Bax Activity ↓ Bcl-2 Activity	50–150 μM 5–50 μM 50–200 μM 20–150 μM 25–100 μM 150–250 μM 25–100 μM	Breast cancer (MCF-7 cells) Lung cancer (H1703 and H1975 cells) Gastric cancer (Ki67 cells) Colon cancer (HT-29 cells, COLO 21 cells) Prostate cancer (PC3 and DU145 cells) Cervical cancer Liver cancer (Huh7 cells)	Xenograft Mice

*↓- decreased, ↑- increased.

FIGURA 0-9

Resveratrolo e catechine

Gli studi hanno dimostrato che il resveratrolo può superare le sue barriere di biodisponibilità quando utilizzato in combinazione con altri polifenoli e farmaci antitumorali. È stato condotto uno studio sulle cellule tumorali della prostata, sia in vitro che in vivo, con resveratrolo e quercetina. Ognuno di questi polifenoli è stato somministrato da solo o in combinazione. Quando il resveratrolo è stato combinato con la quercetina, la sua biodisponibilità è stata rafforzata limitandone la solfatazione, conferendo in tal modo proprietà anti-proliferazione più elevate.

L'ADR è un sale cloridrato, un farmaco antitumorale. Resveratrolo, quercetina, curcumina, e ADR sono state sostanze somministrate da sole e in combinazione anche nel carcinoma ovarico: questa combinazione ha portato a riduzione delle dimensioni del tumore e apoptosi migliorata nei modelli di xenotrapianto del carcinoma ovarico.

È stato condotto uno studio sul resveratrolo insieme a quercetina, apigenina, baicaleina, curcumina, genisteina e EGCG in vitro e in vivo: quando questi composti sono stati somministrati in combinazione, si è verificata una riduzione complessiva del tumore.

Gefitinib è un farmaco antitumorale che, come altri farmaci anticancro, genera resistenza: un potenziale approccio combinatorio di polifenoli a base alimentare con gefitinib potrebbe aiutare a superare la resistenza ai farmaci. È stato condotto uno studio combinato sulla dieta, a base di uva: i polifenoli, in vitro, in cellule di carcinoma mammario e in vivo in un nudo modello di topi. In vitro, lo studio ha rivelato che il resveratrolo, la quercetina e la catechina hanno avuto effetti positivi sul carcinoma mammario; inoltre, quando il resveratrolo, la quercetina e la catechina sono state somministrate in associazione con gefitinib, la resistenza al gefitinib è diminuita. In vivo, i topi sono stati nutriti con gefitinib da solo e in una combinazione 5 mg / kg di resveratrolo, quercetina e catechina insieme a 200 mg / kg di gefitinib per 84 giorni.

Di conseguenza, è stata riscontrata un'inibizione della crescita del tumore mammario e delle metastasi di ossa e fegato in questo di topo.³⁷

37 AAVV, "Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy", in Journal of Molecular Science, 14 September 2019.

Curcumina e acido ellagico

Uno studio in vitro ha verificato l'effetto antimutageno dose-dipendente di acido ellagico, curcumina combinati: si è registrato un aumento significativo del potenziale antimutageno della combinazione rispetto all'effetto dell'acido ellagico o della curcumina usati separatamente, come mostrato in figura fig.1-1.³⁸

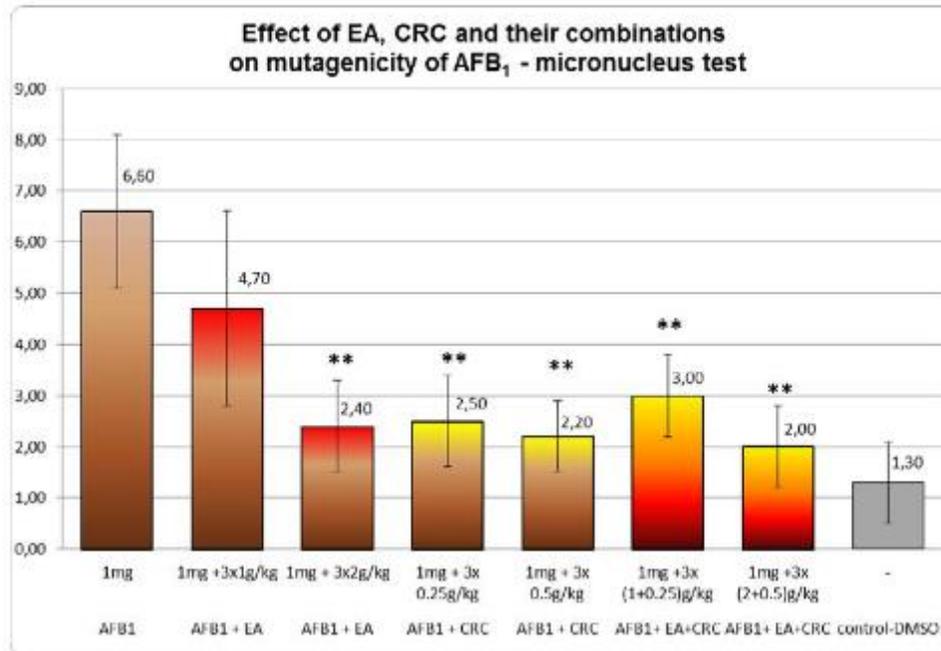


FIGURA 1-1

Resveratrolo e curcumina

Uno studio in vitro ha dimostrato che il trattamento combinatorio con composti naturali di curcumina e resveratrolo nel cancro della prostata ne inibisce la crescita e porta a modulazioni chiave del metabolismo delle cellule tumorali. Tutte le possibili combinazioni di questi composti naturali hanno prodotto effetti sinergici sulle dimensioni e sul peso del tumore, come mostrato in fig.1-2³⁹

38 AAVV, "Antimutagenic Effect of the Ellagic Acid and Curcumin Combinations", in Journal of Environmental & Analytical Toxicology, 2015.

39 AAVV, "Combinatorial treatment with natural compounds in prostate cancer inhibits prostate tumor growth and leads to keymodulations of cancer cell metabolism", in Precision Oncology.

Table 3. Evaluation of synergistic effects by combined treatments in vivo and in vitro						
	Tumor volume ^a	BLISS index	Tumor weight ^a	BLISS index	Distance	BLISS index
CUR	0.63		0.67		0.27	
RES	0.74		0.84		0.23	
CUR + RES	0.43	0.04	0.18	0.33	0.42	-0.02

FIGURA 1-2

Silimarina e Acido clorogenico

In questa indagine, abbiamo valutato gli effetti protettivi della silimarina da sola e combinata con acido clorogenico e / o melatonina contro le lesioni al fegato indotte da CCl₄. I nostri risultati hanno mostrato che una singola dose intraperitoneale di CCl₄ ha prodotto danni al fegato nei ratti e ha dimostrato alterazioni istopatologiche quali necrosi, epatociti degenerati, infiltrazione di cellule infiammatorie, sinusoidi epatici dilatati, steatosi e ampie macchie di tessuto fibroso.

Questi risultati dimostrano che il trattamento dei ratti intossicati con SIL, da sola e combinata con CA e / o ME, ha potenzialmente attenuato la lesione epatocellulare indotta da CCl₄. Diversi studi hanno chiaramente riferito che SIL, CA e ME riducono le alterazioni istopatologiche nei ratti.

Tali conseguenze positive potrebbero essere attribuite agli effetti antinfiammatori e immunomodulatori di SIL, CA e ME: l'efficacia antinfiammatoria del SIL nei ratti indotti da CCl₄ è stata riscontrata in numerosi studi.

Gli effetti antinfiammatori di SIL, CA e ME potrebbero essere spiegati in funzione delle loro attività antiossidanti e di eliminazione dei radicali.

Questo studio dimostra che SIL da sola e/o combinata con CA e / o ME ha protetto il fegato dalle lesioni indotte da CCl₄ attraverso l'attenuazione dell'infiammazione, il danno ossidativo al DNA, l'apoptosi e i cambiamenti fibrotici. Gli effetti della SIL si sono notevolmente intensificati se combinati con CA e ME. Questi risultati suggeriscono un effetto sinergico tra SIL, CA e ME: questa sinergia svolge un ruolo attivo nel loro meccanismo protettivo contro il danno epatico indotto da CCl₄. Tuttavia, gli ipotetici effetti sinergici devono essere ulteriormente confermati utilizzando studi farmacologici, tossicologici e clinici dettagliati.⁴⁰

40 AAVV., "Protective Effects of Silymarin, Alone or in Combination with Chlorogenic Acid and/or Melatonin, Against Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity", Pharmacog., Maggio 2016.

Capitolo 4: Analisi critica della biodisponibilità dei polifenoli contenuti in due formule composte di estratti secchi titolati in termini di efficacia della formulazione

INFORMAZIONI NUTRIZIONALI		
INGREDIENTI	PER DOSE	% VNR*
COENZIMA Q10	20 mg	
LICOPENE TIT. al 6% LICOPENE	10mg 0,6 mg	
CURCUMA E.S.TIT. 95% di CURCUMINA	200mg 190 mg	
MELOGRANO E.S.TIT. 40% di AC.ELLAGICO	200mg 80 mg	
RHODIOLA ROSEA E.S.TIT. 3% di ROSAVINE	200mg 6 mg	
POLYGONUM CUSPIDATUM E.S.TIT. 98% RESVERATROLO	100mg 98 mg	

*%VNR : Valori Nutrizionali di Riferimento. Quando non pertinente il valore è No

INGREDIENTI

Curcuma rizoma (Curcuma longa L.) e.s. tit. 95% in curcumina, Melograno frutto (Punica granatum) e.s.* tit. 40% in acido ellagico, Rhodiola rosea radice (Rhodiola rosea L.) e.s.* tit. 3% in rosavine, Agente di carica: cellulosa microcristallina; Resveratrolo (Polygonum cuspidatum L. radice e.s. tit. 98% in resveratrolo), Coenzima Q10, Licopene (Lycopersicon esculentum L. Karsten ex Farw. frutto tit. 6% in Licopene), Antiagglomeranti: biossido di silicio, magnesio stearato vegetale.*carrier: maltodestrina

FIGURA 1-3

La formula riportata in fig.1-3 si riferisce ad un integratore alimentare notificato al Ministero della Sanità con codice. Il prodotto contiene cinque diversi composti fenolici in quantità standardizzate: licopene, acido ellagico, curcuma, rosavine, resveratrolo e il coenzima Q10. Il claim del prodotto fa riferimento all'azione antiossidante di tutti i suoi componenti e alla caratteristica di tonico adattogeno della *rodhiola rosea*.

Partendo dal presupposto che i flavonoidi presenti in questa formula hanno bassa biodisponibilità ho valutato l'applicazione di quanto emerso dall'analisi effettuata nel corso dei capitoli precedenti alla formula.

Non ho trattato specificatamente in questo lavoro, il licopene, ma la dose di licopene generalmente indicata al giorno è di 2,5 mg: la formula ne contiene 0,6 mg e quindi circa il 25%, la biodisponibilità del licopene però aumenta al diminuire delle dimensioni dei cristalli. Uno studio condotto da Richelle ed al. ha dimostrato che una riduzione delle dimensioni dei cristalli di licopene

naturale da 5 a 0,5 mm (cioè di 10 volte) consente un aumento della biodisponibilità di circa il 25%. Si dovrà quindi valutare questo parametro con il laboratorio di produzione e valutarne la sostituzione con una materia prima a cristalli più piccoli.

Per la curcumina si potrà valutare l'utilizzo del *fitosoma curcuma* oppure l'aggiunta di piperina che può portare ad un incremento cinetico di curcumina del 2000%. 'Allo stesso modo, anche se in maniera certamente meno impattante numericamente parlando, la piperina incrementa la biodisponibilità orale del coenzima Q10, del beta-carotene, del resveratrolo, rispettivamente del 30, del 50 e del 100% circa.⁴¹

Gli incrementi di biodisponibilità sopra riportati sono ottenibili con un quantitativo di piperina di 20 mg per dose, quantitativo che non dovrebbe avere effetti collaterali sulla base degli studi, anche se non numerosi, disponibili. La letteratura riporta alcuni effetti collaterali a seguito dell'assunzione di piperina, per cui essa risulta controindicata in caso di gastrite, ulcera gastrica, reflusso gastroesofageo, emorroidi ed ipertensione, sarà, quindi, necessario valutare con cautela l'opportunità di aggiungere piperina alla formula, sulla base dell'utenza target del prodotto e dell'eventuale utilizzo prolungato e continuativo.

La curcumina poi, come riportato nel Capitolo 4, ha mostrato un potenziamento dei suoi effetti benefici quando unita ad acido ellagico e resveratrolo, entrambi presenti nella formula: questa combinazione dà una ragionevole certezza di potenziamento degli effetti, anche senza dover aumentare la biodisponibilità del prodotto.

L'efficacia della *rodhiola rosea* è riportata in un assessment della Commissione Europea che, a valle delle analisi cliniche effettuate, ne conferma la plausibilità dell'uso come adattogeno se titolata al 3% in rosavina, in quantitativi compatibili con quelli della formula in questione ⁴². Anche altri studi supportano i quantitativi della formula⁴³

41 Di Pierro Francesco, Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica (Italian Edition), CEC Editore, gennaio 2014.

42 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), in "Assessment report on Rhodiola rosea L., rhizoma et radix."

43 AAVV., "Rhodiola rosea: a Phytomedicinal Overview".

INFORMAZIONI NUTRIZIONALI

INGREDIENTI	PER DOSE	% VNR*
CARDO MARIANO E.S.TIT. 80% SILIMARINA	600 mg 480 mg	
CARCIOFO E.S.TIT. 2,5% AC.CLOROGENICO	300 mg 7,5 mg	
TARASSACO E.S.TIT. 2% INULINA	300 mg 6 mg	
BETULLA E.S.TIT. 2,5% IPEROSIDE	200 mg 5 mg	
SCHISANDRA E.S.TIT. 3% SCHISANDRINA	200 mg 6 mg	

*%VNR : Valori Nutrizionali di Riferimento. Quando non pertinente il valore è No

INGREDIENTI

Cardo Mariano e.s. (*Silybum marianum* Gaertn. - fructus) titolato all' 80% in silimarina; Carciofo e.s. (*Cynara scolymus* L. - folium) titolato al 2,5% in acido clorogenico; Tarassaco e.s. (*Taraxacum officinale* Weber - radix) titolato al 2% in inulina; Calcio fosfato (agente di carica); Betulla e.s. (*Betula pendula* Roth. - folium) titolato al 2,5% in iperoside; Schisandra e.s. (*Schisandra chinensis* Baill. - fructus) titolato al 3% in schisandrina; Cellulosa microcristallina, Talco (agenti di carica); Magnesio stearato (agente antiagglomerante); Carbonato di calcio; Ipromellosa; Colorante: Ferro ossido.

FIGURA 1-4

Ho analizzato la formula riportata in fig.1-4 per la presenza di *cardo mariano* titolato all'80% di *silimarina*: il claim del prodotto indica che il cardo favorisce la funzione epatica.

Mi sono concentrata solo sul *flavolignano silimarina* in quanto l'altro flavonoide presente, l'iperoside da betulla, ha un obiettivo di drenaggio.

Se pure la silibinina, componente principale della silimarina e responsabile degli effetti patoprotettivi, ha una biodisponibilità quasi nulla, la monografia dell'OMS riporta gli avvalorati da dati clinici per il trattamento di supporto delle epatiti acute e croniche e delle cirrosi indotte da alcool, farmaci o tossine. La dose giornaliera standardizzata richiesta per supportare tali effetti è di 200-400 mg di silimarina calcolata come silibina, la formula pertanto già rispetta tali requisiti.

Inoltre, la formula contiene anche acido clorogenico, che, come dimostrato nel capitolo 4, potenzia l'effetto della silimarina. Si potrebbe valutare l'opportunità di aggiungere melatonina.

In questa formula l'utilizzo del *fitosoma cardo mariano* darebbe la possibilità di dimezzare la dose di silimarina, a vantaggio probabilmente di un risparmio sulla droga standardizzata: da valutare però se il maggiore costo del fitosoma vanificherebbe tale risparmio.

L'eventuale aggiunta di piperina invece potrebbe da un lato migliorare la biodisponibilità e quindi, anche in questo caso, dare la possibilità di risparmiare sulla droga standardizzata, ma dall'altro

avrebbe comunque le potenziali controindicazioni derivanti da un uso prolungato, anche se presente nella quantità di 20 mg per dose.

Poiché però, come ho già evidenziato, sono stati riportati alcuni effetti collaterali a seguito dell'assunzione di piperina, per cui essa risulta controindicata in caso di gastrite, ulcera gastrica, reflusso gastroesofageo, emorroidi ed ipertensione, bisognerà valutare l'opportunità di aggiungere piperina alla formula sulla base dell'utenza target del prodotto.

Conclusione

Per tutti i composti studiati esiste la versione fitosiomale con risultati sempre di rilievo in termini di aumento della biodisponibilità. Tutti inoltre possono beneficiare dell'eventuale combinazione con dei bioenhancer, come la piperina, per aumentare la propria biodisponibilità: due metodi di incremento della biodisponibilità sono stati studiati misurando i livelli di sostanza nel plasma dopo l'ingestione orale.

Il terzo metodo ha invece evidenziato come i composti studiati possano beneficiare dell'effetto combinatorio, quello derivante dalla combinazione di più sostanze insieme nella stessa formula. Gli studi riportati mostrano come la combinazione di più sostanze abbia effetti epigenetici benefici di varia natura e proprietà antiossidanti dimostrate in vitro con quantità plasmatiche di sostanza inferiori rispetto alla quantità necessaria per avere lo stesso effetto se assunte da sole. In termini di metodologia si prefigura quindi una grande differenza: si vanno, cioè, a misurare i benefici apportati da una certa quantità di sostanza, anche se piccola, in condizioni combinatorie. L'obiettivo di questa metodologia risulta quello di incrementare l'efficacia della sostanza a fini terapeutici, senza necessariamente aumentare la quantità biodisponibile.

Ritengo quindi questa tecnica metodologica la più sostenibile, sia a livello di costi che di potenzialità terapeutiche. Ritengo che su di essa si dovrebbero concentrare maggiormente gli studi futuri; quelli recenti, in continuo aumento, indicano che il potenziale step di miglioramento dell'efficacia terapeutica sembra essere più forte rispetto agli step di incremento di biodisponibilità delle singole sostanze. Pur rimanendo la biodisponibilità un parametro fondamentale che può dare un contributo rilevante alle formulazioni fitoterapiche, ritengo che lo studio sull'efficacia che le combinazioni di polifenoli possono raggiungere, sia una strada molto lunga, ma con grandi opportunità ancora sconosciute.

Bibliografia

Di Pierro Francesco, “Argomenti di Fitoterapia Biofarmaceutica” (Italian Edition), CEC Editore, Gennaio 2014.

AAVV, “Polyphenols, dietary sources and bioavailability”, in *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, Febbraio 2007.

AAVV, “Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy”, in *International Journal of molecular science*, 14 Settembre 2019.

AAVV, “Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action”, in *Nutrients*, 8 Novembre 2010.

Biagi Claudio, “Lezione/Modulo di Fitogenomica” in Master di Fitoterapia applicata, Università Unicusano.

AAVV, “Polyphenols: Mechanisms of action in human health and disease”, second edition, Volume 1, in Academic Press.

Occhionero Giovanni, “Lezione/Modulo di Fitogenomica” in Master di Fitoterapia applicata, Università Unicusano.

Lopresti A., “The Problem of Curcumin and Its Bioavailability: Could Its Gastrointestinal Influence Contribute to Its Overall Health-Enhancing Effects?”, in *American Society for Nutrition*, 2018.

Giordanengo C., “Fitopreparazione in farmacia: allestimento, controllo di qualità e studio di stabilità”, in *Tesi di laurea*, 2009-2010.

AAVV, “Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials”, in *Nutrients*, Dicembre 2018.

AAVV, “The Role of Polyphenolic Antioxidants in Health, Disease, and Aging”, in *REJUVENATION RESEARCH*, Volume 13, Number 6, 2010.

AAVV, “Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy”, in *Journal of Molecular Science*, 14 September 2019.

Surai P.F., “Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives”, in *Antioxidants*, 2015.

Campo J., “Proprietà nutraceutiche dei principi attivi naturali: i curcuminoidi”, in *Tesi di laurea*,

2012-2013.

AAVV, “Enhancing the Delivery of Resveratrol in Humans: If Low Bioavailability is the Problem, What is the Solution?”, in *Molecules* 2014.

AAVV, “Health Effects and Bioavailability of Dietary Flavonols”, in *Free radical Research*.

AAVV, “Bioavailability of Tea Catechins and Its Improvements”, in *Molecules*, August 2018.

Gurley B., “Emerging Technologies for Improving Phytochemical Bioavailability: Benefits and Risks”, in *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, June 2011.

Kidd P.M., “Bioavailability and Activity of Phytosome Complexes from Botanical Polyphenols: The Silymarin, Curcumin, Green Tea, and Grape Seed Extracts”, in *Alternative Medicine Review* Volume 14, Number 3, 2009.

AAVV, “Appraisal of Bioenhancers in Improving Oral Bioavailability: Applications to Herbal Medicinal Products”, in *Journal of Pharmaceutical Research International*, 2018.

AAVV, “Bioavailability Enhancement by Piperine: A Review”, in *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2014.

AAVV, “Bioavailability Enhancement by Piperine: A Review”, in *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2014.

AAVV., “Metabolism, Transport and Drug–Drug Interactions of Silymarin”, in *Molecules*, 2019

AAVV, “Piperine enhances the bioavailability of silybin via inhibition of efflux transporters BCRP and MRP2”, in *Phytomedicine*, 2019.

AAVV, “Antimutagenic Effect of the Ellagic Acid and Curcumin Combinations”, in *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 2015.

AAVV, “Combinatorial treatment with natural compounds in prostatecancer inhibits prostate tumor growth and leads to keymodulations of cancer cell metabolism”, in *Precision Oncology*.

AAVV, “Protective Effects of Silymarin, Alone or in Combination with Chlorogenic Acid and/or Melatonin, Against Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity”, *Pharmacogn. Maggio* 2016.

“Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)”, in *Assessment report on Rhodiola rosea L., rhizoma et radix*.

AAVV., “*Rhodiola rosea*: a Phytomedicinal Overview.