



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

RESVERATROLO: APPROCCI PER INCREMENTARE LA
BIODISPONIBILITÀ

RELATORE: PROF. RAFFAELLA FILIPPINI

LAUREANDA: ILARIA MORO

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

Introduzione	4
1 - Resveratrolo: aspetti chimico-strutturali e il suo potenziale	5
1.1 - Resveratrolo.....	5
1.1.1 - Caratteristiche chimiche.....	6
1.1.2 – Biosintesi.....	6
1.1.3 - Piante che contengono resveratrolo.....	9
1.2 - Il fascino del resveratrolo	10
1.3 - Il paradosso francese	11
1.4 - Il resveratrolo nella medicina tradizionale cinese.....	12
2 - Attività e applicazioni terapeutiche del resveratrolo	13
2.1 - Proprietà antiossidante.....	13
2.2 - Resveratrolo e oncologia	14
2.2.1 - Studi clinici	16
2.2.2- Resveratrolo come fitoestrogeno.....	17
2.3 - Malattie del sistema cardiovascolare e potenzialità del resveratrolo.....	18
2.4 - Trattamento del diabete	19
2.5 - Malattie neurologiche	20
2.6 - Patologie epatiche.....	21
2.7 - Utilizzo del resveratrolo nella dermocosmesi	23
2.8 - Il resveratrolo come antivirale.....	24
2.8.1 - Resveratrolo e COVID19.....	26
2.9 - Alcune considerazioni sulle attività.....	26
3 - Farmacocinetica e biodisponibilità del resveratrolo	28
3.0 - Introduzione	28
3.1- Assorbimento.....	30
3.1.1 - Assorbimento e distribuzione del resveratrolo.....	30
3.1.2 - Influenza del cibo sull'assorbimento	31
3.1.3 - Assorbimento e biodisponibilità	32

3.1.4 - Emivita del resveratrolo	33
3.2 - Metabolismo ed eliminazione	34
3.2.1 - Metabolismo ed eliminazione del resveratrolo	35
3.2.2 - Biotrasformazioni ulteriori dei metaboliti del resveratrolo	37
3.2.3 - Eliminazione del resveratrolo	39
3.3 - Tossicità e reazioni avverse	40
3.4 - Considerazioni sulla biodisponibilità del resveratrolo e la sua influenza nel dosaggio	41
4 - Tecniche migliorative della biodisponibilità del resveratrolo	42
4.0 - Introduzione	42
4.0.1. - Fattori che influenzano la biodisponibilità della via orale	42
4.1 - Enhancer di origine vegetale	43
4.2 - Fitosomi	47
4.3 - Sinergie tra combinazioni di fitoterapici	50
4.4 - Tecniche formulative	51
4.4.1 - Niosomi	52
4.4.2 - Nanocarriers lipidici e liposomi	53
4.4.3 - Nanoemulsioni	55
4.4.4 - Micelle	58
4.4.5 - Nanoparticelle polimeriche	61
4.4.6 - Nanoparticelle di silice mesoporosa	63
4.4.7- Dispersioni solide	64
4.4.8 - Nanocristalli	66
4.4.9 - Complessi con ciclodestrine	69
5 - Discussione e conclusioni	71
5.1 – Considerazioni finali	72
BIBLIOGRAFIA	73
SITOGRAFIA	79

Introduzione

Il resveratrolo ha suscitato un notevole interesse negli ultimi decenni sia per la sua origine “naturale” sia per i benefici che può apportare alla salute, grazie alle azioni antiossidanti, anti-infiammatorie, cardioprotettive, neuroprotettive e antitumorali. Tuttavia, la sua rapida metabolizzazione limita la sua efficacia biologica nell'organismo e, di conseguenza, le sue potenziali applicazioni cliniche. Per migliorarne le proprietà farmacocinetiche, in particolare la biodisponibilità, sono state adottate diverse metodologie caratteristiche della tecnologia farmaceutica, grazie alle quali è stato possibile osservare un aumento dell'attività biologica del resveratrolo, specialmente nelle sue azioni antitumorali. Questi risultati incoraggiano a condurre ulteriori studi in vivo per individuare i migliori sistemi di somministrazione del resveratrolo che possono essere utilizzati in ambito clinico.

In questo elaborato di tesi saranno analizzate le caratteristiche chimiche della molecola, le sue attività biologiche e le applicazioni terapeutiche che ne conseguono, la sua complessa farmacocinetica e saranno espone le tecniche migliorative finora studiate per migliorare la sua biodisponibilità. Il primo capitolo descrive la molecola dal punto di vista strutturale e geografico, delinea il profilo di utilizzo nella tradizione orientale e racconta della ribalta del resveratrolo nelle cronache del secolo scorso. Il secondo capitolo tratta le evidenze scientifiche finora ottenute riguardo alle attività del resveratrolo nella medicina convenzionale e nella cosmesi. Il terzo capitolo recupera argomenti di farmacologia e cerca di individuare quale sia il percorso metabolico del resveratrolo una volta somministrato all'essere umano. Infine il quarto capitolo passa in rassegna, per mezzo della descrizione di alcuni esempi, le tecniche migliorative della biodisponibilità del resveratrolo dopo somministrazione principalmente per via orale e nel capitolo conclusivo sono confrontati alcuni aspetti di queste tecnologie innovative.

1 - RESVERATROLO: ASPETTI CHIMICO-STRUTTURALI E IL SUO POTENZIALE

1.1 - Resveratrolo

Il resveratrolo (in FIGURA 1) è un composto fenolico di origine vegetale caratterizzato da Michio Takaoka per la prima volta negli anni Quaranta del Novecento dalle radici di veratro bianco (*Veratrum grandiflorum* O.).

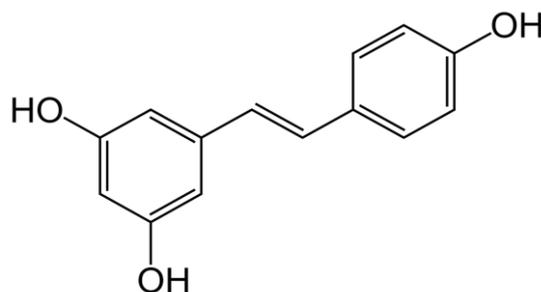


FIGURA 1. Resveratrolo.

Appartiene alla classe dei polifenoli, metaboliti secondari delle piante molto diversi tra loro ma tutti caratterizzati dalla presenza di molteplici gruppi fenolici. I polifenoli sono ormai famosi universalmente per la loro proprietà antiossidante. Le strutture di base dei polifenoli più noti sono illustrate in FIGURA 2.

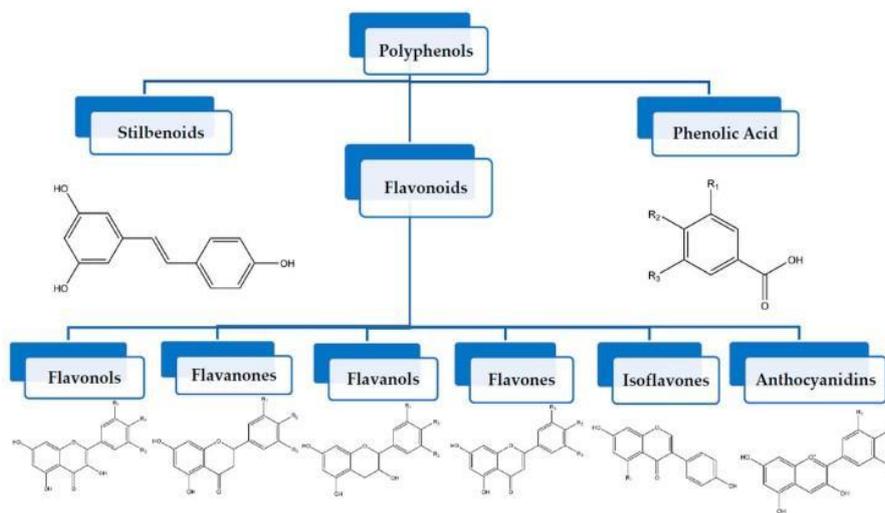


FIGURA 2. Classificazione dei polifenoli più noti e loro strutture chimiche (Arora *et al.*, 2019).

1.1.1 - Caratteristiche chimiche

Il resveratrolo è uno stilbene triidrossilato¹, nello specifico è un 3,5, 4'- triidrossi-stilbene.

Esiste in due isoforme: *cis*-resveratrolo e *trans*-resveratrolo (FIGURA 3). Quest'ultima isoforma è la più stabile dal punto di vista stereochimico e risulta più abbondante e potente per quanto riguarda gli effetti biologici. L'isomerizzazione da *trans*-resveratrolo a *cis*-resveratrolo può essere indotta dall'esposizione ai raggi UV a 260 nm per più di 150 minuti e da pH superiori a 11.

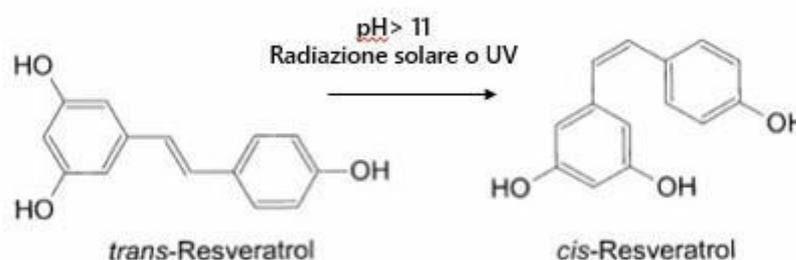


FIGURA 3. Stereoisomeri del resveratrolo.

1.1.2 – Biosintesi

Il resveratrolo è un composto aromatico la cui complessa sintesi avviene nei plastidi della cellula vegetale. La biosintesi (FIGURA 4) inizia da una fenilalanina o da una tirosina tramite l'azione di due liasi specifiche, PAL (Phenylalanine Ammonia Lyase) e TAL (Tyrosine Ammonia Lyase) che scindono il gruppo amminico dal rispettivo aminoacido con la formazione di acido cinnamico. Quest'ultimo viene trasformato in acido *p*-cumarico che a sua volta si lega al Coenzima A. Il 4-cumaroil-CoA viene quindi condensato con tre molecole di malonil-CoA, poi per azione dell'enzima stilbene sintasi vengono eliminati 4 atomi di carbonio, sotto forma di CO₂ con formazione di una molecola di resveratrolo.

¹ Uno stilbene è un diarilene, cioè un idrocarburo composto da un etene sostituito con un gruppo fenilico su entrambi gli atomi di carbonio.

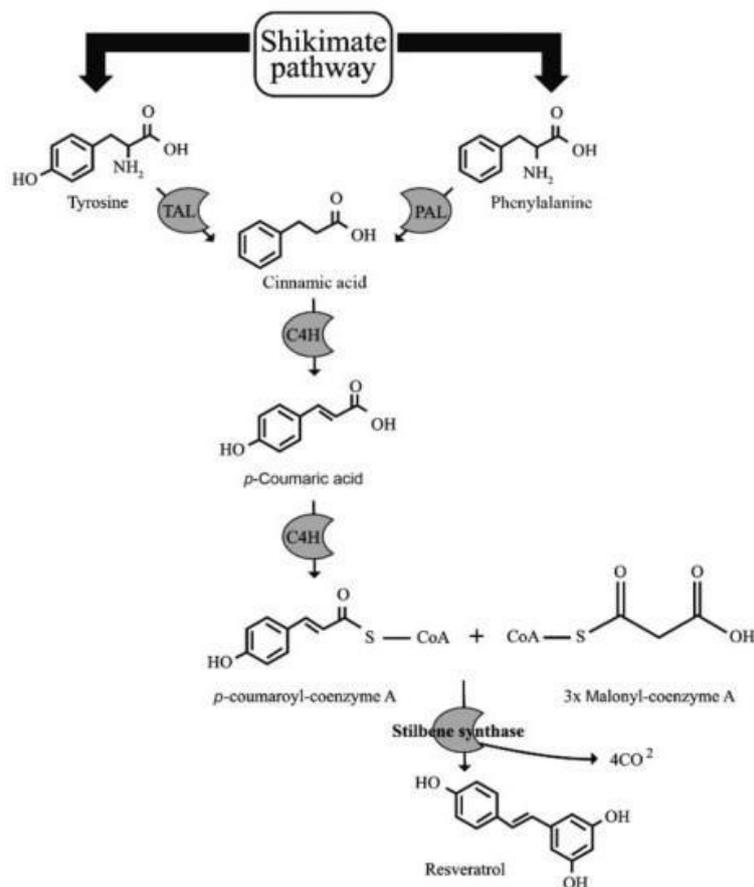


FIGURA 4. Sintesi del resveratrolo lungo la via dell'acido shikimico (Riccio *et al.*, 2020).

È possibile sintetizzare la molecola utilizzando bioreattori con colture di batteri (ad esempio *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum*) e lieviti, superando i processi e le difficoltà di estrazione, isolamento e purificazione della molecola dal fitocomplesso della pianta di origine.

I requisiti della molecola sintetica sono riportati nell'allegato al Regolamento di esecuzione (UE) della Commissione europea del 22 aprile 2022 che modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2017/2470 per quanto riguarda le specifiche del nuovo alimento *trans*-resveratrolo (da fonte microbica) (TABELLA 1).

TABELLA 1. Allegato al Regolamento di esecuzione (UE) della commissione del 22 aprile 2022 che modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2017/2470 per quanto riguarda le specifiche del nuovo alimento *trans*-resveratrolo (da fonte microbica). Da: <https://eur-lex.europa.eu>

ALLEGATO

Nella tabella 2 (Specifiche) dell'allegato del regolamento di esecuzione (UE) 2017/2470, la voce relativa al *trans*-resveratrolo è sostituita dalla seguente:

Nuovo alimento autorizzato	Specifiche
« <i>Trans</i> -resveratrolo	<p>Descrizione/definizione</p> <p>Sintetico Il <i>trans</i>-resveratrolo si presenta sotto forma di cristalli di colore dal biancastro al beige.</p> <p>Denominazione chimica: 5-[(E)-2-(4-idrossifenil)etenil]benzen-1,3-diolo</p> <p>Formula chimica: C₁₄H₁₂O₃</p> <p>Peso molecolare: 228,25 Da</p> <p>N. CAS: 501-36-0</p> <p>Purezza</p> <p><i>Trans</i>-resveratrolo: ≥ 98 % - 99 %</p> <p>Sottoprodotti totali (sostanze correlate): ≤ 0,5 %</p> <p>Ogni singola sostanza correlata: ≤ 0,1 %</p> <p>Ceneri solfate: ≤ 0,1 %</p> <p>Perdita all'essiccazione: ≤ 0,5 %</p> <p>Metalli pesanti</p> <p>Piombo: ≤ 1,0 ppm</p> <p>Mercurio: ≤ 0,1 ppm</p> <p>Arsenico: ≤ 1,0 ppm</p> <p>Impurità</p> <p>Diosopropilammina: ≤ 50 mg/kg</p> <p>Fonte microbica: ceppo geneticamente modificato del <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p> <p>Aspetto: polvere il cui colore varia tra biancastro e leggermente giallo</p> <p>Tenore di <i>trans</i>-resveratrolo: min. 98 % p/p (sulla base del peso a secco)</p> <p>Ceneri: max. 0,5 % p/p</p> <p>Umidità: max. 3 % p/p».</p>

Nelle piante la produzione di resveratrolo varia sensibilmente in quantità, poiché la sintesi di questo composto non è solo costitutiva, ma anche inducibile. Gli stilbenoidi infatti sono fitoalessine, ovvero molecole di basso peso molecolare che la pianta produce in risposta a stimoli stressori come infezioni batteriche e fungine oppure a seguito di traumi meccanici. Più di 70 tipi di piante sintetizzano il resveratrolo proprio con funzione fitoalessinica. In particolare questa molecola è stata osservata in alte concentrazione nelle foglie di *Vitis vinifera* L. danneggiate, sottoposte a raggi UV o infette dal fungo *Botrytis cinerea*.

Il resveratrolo può andare incontro a polimerizzazione, che coinvolge fino a otto unità. I suoi polimeri sono conosciuti come viniferine: nello specifico, il dimero prende il nome di ϵ -viniferina, il trimero ciclico di α -viniferina (sono riportate le strutture nelle FIGURE 5 e 6 sottostanti).

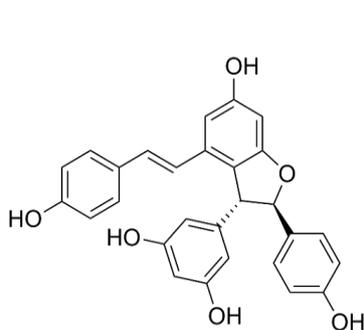


FIGURA 5. ϵ -viniferina

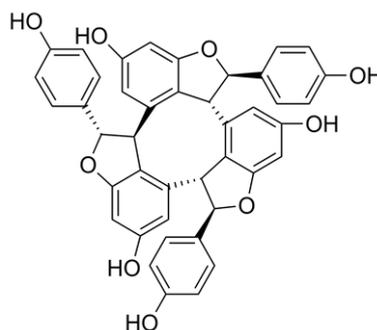


FIGURA 6. α -viniferina

1.1.3 - Piante che contengono resveratrolo

Il resveratrolo viene caratterizzato nella pianta di *Veratrum grandiflorum* M. da M. Takaoka attorno al 1940, inizialmente solo nelle radici, in seguito anche nelle foglie che sono ricche dello stilbenoide soprattutto a seguito di traumi chimici o meccanici. Circa vent'anni più tardi fu isolato anche nella radice di *Polygonum cuspidatum*, il cui estratto arriva a contenere l'8% di resveratrolo e ha un ruolo di rilievo nelle medicine tradizionali cinese e giapponese.

Il resveratrolo si trova in molte piante i cui prodotti spesso sono fonti alimentari per l'essere umano (Riccio *et al.*, 2020). La più conosciuta tra le piante che producono resveratrolo è sicuramente la vite, sia quella comune (*Vitis vinifera* L.) nelle sue *cultivar*, ad esempio *Cabernet Sauvignon* o *Pinot noir*, che la vite muscardina (*Vitis rotundifolia* Michx) originaria del continente Americano. Principalmente, il composto si concentra nella buccia degli acini delle uve rosse, insieme a antocianine, flavanoli e flavonoli, ma è presente anche nei semi, nei piccioli e nei raspi. Il resveratrolo si ritrova anche nei derivati dell'uva come per esempio nel vino, soprattutto se rosso. Infatti, a differenza del vino bianco, il procedimento di vinificazione dei rossi prevede la macerazione del mosto sulle bucce e l'alcol che si forma per fermentazione favorisce l'estrazione del resveratrolo dalla buccia al vino. I due stereoisomeri della molecola coesistono nella vite e nel vino, tuttavia secondo Burns *et al.* (2002) l'isomero *cis*-resveratrolo non si ritrova nell'estratto d'uva.

Anche il seme di *Arachis hypogaea* L., l'arachide, e i suoi derivati (olio e burro) contengono resveratrolo e altri stilbenoidi, flavonoidi e fitosteroli. Insieme ad altri composti fenolici, a xantine e agli acidi oleico e linoleico, il resveratrolo si ritrova anche nei tegumenti dei pistacchi (*Pistacia vera* L.).

Altre piante che contengono resveratrolo, i cui frutti sono fonti alimentari per l'uomo sono: *Vaccinium myrtillus* L. (mirtillo), *V. mirtulus* L. (un'altra specie di mirtillo, conosciuta come bilberry), *V. macrocarpon* Ait. (cranberry, mirtillo rosso americano), *Artocarpus heterophyllus* Lam. (pianta sempreverde indiana il cui frutto è conosciuto come jackfruit o giaco).

È stato isolato anche dalla mora di rovo, dalla mora di gelso (rispettivamente *Rubus ulmifolius* S. e *Morus nigra* L.) e nei derivati ottenuti da questi frutti come marmellate, succhi, vini e cordiali; si ritrova infine resveratrolo in tutti i prodotti alimentari ottenuti dal seme di *Theobroma cacao* L.: pasta di cacao, burro di cacao, polvere di cacao e cioccolato, per citarne alcuni.

La **TABELLA 2** illustra i quantitativi di resveratrolo rilevati nelle fonti alimentari citate e le tecniche analitiche con le quali sono stati definiti.

TABELLA 2. Fonti alimentari in cui è presente il resveratrolo (Riccio *et al.*, 2020).

Sostanze Naturali	Alimenti comuni	Metodo di definizione	Contenuto di Resveratrolo
 Mirtilli	Mirtilli crudi	LC-MS/MS	49.3-140.0 pmol/g
	Succo di mirtilli	LC-MS/MS	89.8 pmol/g
 Cacao	Polvere di cacao	HPLC	1.25-2.27 µg/g
	Cioccolato fondente	HPLC	0.25-0.43 µg/g
	Cioccolato al latte	HPLC	0.05-0.17 µg/g
 Lamponi	Lamponi crudi	HPLC-DAD	712.2 ng/g
	Succo di lamponi	HPLC-DAD	533.4-598.2 ng/g
 Uva	Uva rossa	HPLC	1.348-15.472 mg/kg
	Uva bianca	LC-MS/MS	0.011-0.030 µg/mg
	Succo d'uva	HPLC	0.05-0.67 mg/l
	Vino rosso	HPLC-DAD	0.13-0.64 mg/kg
	Vino bianco	HPLC-DAD	0.04-0.34 mg/kg
 Arachidi	Arachidi crudi	HPLC-DAD	0.03-1.92 µg/g
	Burro d'arachidi	HPLC	0.148-0.504 µg/g
 Pistacchi	Pistacchi crudi	HPLC-DAD	1.04-1.67 µg/g

1.2 - Il fascino del resveratrolo

La presenza di più gruppi ossidrilici legati ad anelli benzenici permette di includere il resveratrolo nella superclasse con proprietà salutistiche dei polifenoli, conosciuti ormai universalmente per le loro proprietà antiossidanti: si tratta quindi di una sostanza capace di neutralizzare i radicali liberi e le ROS (specie reattive dell'ossigeno).

Questa proprietà ha stimolato l'interesse verso questa molecola nel campo dei rimedi salutistici e della dermocosmesi. Il ruolo degli antiossidanti è riconosciuto come fondamentale in molti campi medici, a partire dalla prevenzione di molte malattie ma anche nel controllo della progressione di tumori, malattie neurodegenerative, diabete e malattie del sistema cardiocircolatorio.

La letteratura scientifica pubblicata sul resveratrolo è consistente: la molecola non solo ha potenzialità per future applicazioni terapeutiche ma presenta anche molte problematiche che necessitano di approfondimento per quanto riguarda la sua farmacocinetica, la biodisponibilità e l'esigenza di individuare soluzioni tecnologico-formulative capaci di sfruttare al pieno questo potenziale.

Il resveratrolo è attualmente in studio per comprendere fino in fondo le sue potenzialità: le evidenze di efficacia nella terapia di molti tumori, ma anche nella loro prevenzione, sono molteplici; il ruolo cardioprotettivo e le sue potenzialità nel trattamento di diabete e obesità sono interessanti sia

per lo sviluppo di integratori da associare alle terapie farmacologiche. Nel capitolo successivo saranno enumerate tutte le attività di questa biomolecola farmaceuticamente allettante.

Ribadire la necessità di ulteriori studi atti a conoscere, comprendere e valorizzare al massimo il resveratrolo risulta imprescindibile, a maggior ragione in un panorama sociale come quello odierno in cui malattie sempre più complessi minacciano un'aspettativa di vita sempre più lunga ma la cui qualità sembra andare scemando.

Non è da sottovalutare nemmeno il fascino dell'origine "naturale" del resveratrolo che proprio per questo può essere utilizzato non solo come molecola ma anche nell'estratto *in toto* della pianta che lo produce. È nota la tendenza dell'essere umano a vedere in tutto ciò che viene presentato come "di origine naturale" una qualche sorta di panacea. Proliferano infatti in commercio gli integratori alimentari a base di resveratrolo, come molecola purificata, sintetica, ma anche come estratto di *P. cuspidatum* (contenente fino all'8% di RESV) in combinazione con fitonutrienti e vitamine oppure come estratto di *V. vinifera*.

1.3 - Il paradosso francese

La ribalta di questa molecola risale ai primissimi anni Novanta, quando un ricercatore dell'università di Bordeaux, Serge Renaud (1927-2012), coniò l'espressione "paradosso francese" avendo osservato una ridotta incidenza di malattie coronariche nella popolazione francese, nonostante la loro dieta ricca di formaggi, fonte di grassi saturi, e vino rosso. Renaud basò le sue considerazioni sia sul proprio lavoro di ricerca che sui dati epidemiologici dell'epoca. Le prime spiegazioni chiamarono in causa il resveratrolo e il suo carattere antiossidante, ma anche evidenze cliniche di riduzione del rischio aterosclerotico sui consumatori di moderate quantità di vino rosso come:

- riduzione dell'aggregazione piastrinica,
- incremento dei livelli plasmatici del colesterolo-HDL
- bassa ossidazione delle LDL.

La risonanza mediatica fu enorme e i consumi di vino rosso incrementarono in virtù delle proprietà cardioprotettive, in particolare nel nord del continente americano. Le ricerche successive tuttavia non hanno trovato associazioni convincenti che giustificano tali risultati, ma anzi hanno sottolineato come la componente alcolica del vino sia in realtà un fattore di rischio cardiovascolare, nonostante Renaud considerasse un consumo moderato di vino rosso (circa 30-40 g) durante il pasto. Tra le altre ipotesi successive formulate per spiegare il fenomeno la presenza di molti vegetali ricchi di folati nella dieta francese.

Al di là alle evidenze esistono anche molte critiche al "paradosso francese": risulta paradossale che i dati su cui si basò Renaud comparavano le diete francese e americana, estremamente

diverse, come noto, sia dal punto di vista calorico che nutrizionale. Non venne considerato nemmeno lo stile di vita completamente differente e nemmeno il contributo della cultura della dieta mediterranea: prendendo in considerazione dati epidemiologici di altri paesi del sud dell'Europa infatti l'incidenza di malattie cardiovascolari è similmente contenuta soprattutto grazie a questo pregevole modello di alimentazione.

Il "paradosso francese" suscita ancora molto fascino nel campo del marketing per produttori di vino rosso e per i paesi che ne esportano grandi quantitativi (tra cui la Francia) nonostante sembri risultare più una correlazione statistica casuale piuttosto che una forte relazione causa-effetto.

1.4 - Il resveratrolo nella medicina tradizionale cinese

L'Hu Zhang, in cinese "虎杖" (Hǔ Zhàng), noto scientificamente come *Polygonum cuspidatum*, è una pianta utilizzata nella medicina tradizionale cinese da secoli. È noto anche con il nome comune di "giglio giapponese" o "rabarbaro cinese." Nella medicina cinese, la parte della pianta di Hu Zhang utilizzata con maggiore frequenza è la radice, sebbene anche altre parti possano essere utilizzate a fini terapeutici.

L'Hu Zhang è noto per contenere il resveratrolo e viene usato principalmente per la sua azione protettiva a livello cardiovascolare. È tradizionalmente impiegato per trattare una serie di condizioni, tra cui dolori addominali, disturbi mestruali, gonfiore addominale, problemi reumatici e altri problemi correlati al flusso energetico e alla circolazione del sangue. Ha anche una storia di utilizzo per problemi gastrointestinali.

La posologia dell'Hu Zhang nella medicina cinese è solitamente personalizzata in base alle esigenze individuali del paziente e alle condizioni specifiche, nonostante la lunga storia di utilizzo del rimedio.

La concentrazione di resveratrolo presente nella preparazione dell'Hu Zhang può variare notevolmente in base a diversi fattori, tra cui la varietà di pianta, le condizioni di crescita, il metodo di estrazione e la preparazione del prodotto finale. In generale la concentrazione di *trans*-resveratrolo rilevata nell' Hu Zhang può variare da circa lo 0,1% al 3% o più. Gli estratti secchi possono contenere da circa lo 0,1% al 2% di *trans*-resveratrolo. La concentrazione esatta dipende dalla marca dell'estratto considerato e dal suo metodo di produzione. Gli estratti liquidi possono variare da circa lo 0,1% al 3% o più di *trans*-resveratrolo, a seconda della marca e della formulazione. Gli integratori a base di Hu Zhang possono avere dosaggi specifici di *trans*-resveratrolo, spesso indicati sull'etichetta del prodotto. Questi dosaggi possono variare notevolmente, ma sono solitamente compresi tra 50 mg e 500 mg per dose.

2 - ATTIVITÀ E APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEL RESVERATROLO

Il resveratrolo è stato intensamente studiato negli ultimi decenni e ha dimostrato, sia *in vivo* che *in vitro*, un ampio spettro di attività dovute alla sua struttura molecolare che gli permette di legare moltissime biomolecole. Tra queste proprietà vale la pena sottolineare la sua attività come agente antitumorale, come agente antiaggregante piastrinico e antiossidante, nonché antinvecchiamento e antinfiammatorio.

2.1 - Proprietà antiossidante

L'attività antiossidante è stata osservata nei mitocondri di cellule cerebrali di ratto, che mostravano l'inibizione del processo di respirazione cellulare se esposte al resveratrolo. Inoltre, è stato dimostrato che il resveratrolo è capace di inibire l'attività del complesso III in maniera competitiva rispetto al coenzima Q. L'attività antiossidante dello stilbenoide in questione si esplica quindi nel mitocondrio non solo durante il processo di captazione degli elettroni spaiati, ma anche per inibizione di un complesso capace di generare radicali liberi.

Gambini *et al.* (2015) inoltre riassume le seguenti attività:

- la capacità di diminuire i livelli di perossido di idrogeno, testata nella linea cellulare MCF-7, tramite l'induzione dei geni che codificano enzimi antiossidanti come la catalasi e la Mn-superossido dismutasi;
- la capacità di inibire la carbonilazione, la nitrificazione e la perossidazione lipidica nelle piastrine umane trattate con nitrito perossido, agente ossidante e nitrosante;
- il potenziamento dell'attività di catalasi, superossido dismutasi, glutatione perossidasi, NADPH-chinone ossidoriduttasi e glutatione-S-transferasi contro lo stress ossidativo in colture di epatociti;
- incremento del Nuclear Factor like-2 e induzione della sua traslocazione nel nucleo con conseguente attivazione degli ARE (antioxidant responsive elements);
- in altri studi condotti su ratti e conigli il resveratrolo si è dimostrato capace di proteggere il midollo spinale dalle lesioni secondarie (per esempio il danno da riperfusione a seguito di ischemia) potenziando il metabolismo energetico e inibendo la perossidazione lipidica.

La maggioranza degli studi *in vitro* tuttavia utilizza concentrazioni di resveratrolo superiori a quelle somministrabili con l'alimentazione; diventa quindi necessario verificare che le concentrazioni a livello plasmatico di resveratrolo libero siano sufficienti ad esplicare la funzione antiossidante e che siano successivamente rilevanti dal punto di vista terapeutico.

D'altro canto il resveratrolo può subire una reazione di auto-ossidazione che porta alla produzione di anione superossido, perossido di idrogeno e di una complessa miscela di emichinoni e chinoni citotossici. Il resveratrolo ossidato inoltre può formare un complesso con il rame che può indurre la frammentazione del DNA.

2.2 - Resveratrolo e oncologia

Nella varia e complessa patogenesi dei tumori, le piante medicinali rappresentano un'enorme risorsa. Alcune sostanze di origine vegetale hanno proprietà citotossiche dirette, basti pensare a tassolo, camptotecina e vincristina, oppure attività immunostimolanti o ancora alcuni fitoterapici possono essere utili nella terapia di supporto.

Gli agenti antitumorali sono in grado di attivare e di interagire con bersagli cellulari (DNA e proteine) capaci di inibire lo sviluppo del cancro bloccando la trasformazione, la proliferazione ed inducendo la morte delle cellule cancerose.

Dati epidemiologici hanno mostrato una stretta relazione tra dieta e vari tipi di cancro: molte sostanze presenti nella nostra dieta infatti sembrano avere proprietà antitumorali e molte di esse sono state analizzate per valutare la loro capacità di inibire alcuni processi cellulari che inducono cancerogenesi.

Il resveratrolo è particolarmente interessante per la sua capacità di interagire con molti bersagli cellulari capaci di arrestare la crescita di cellule maligne inducendo il processo di apoptosi, nel dettaglio in **FIGURA 7**. In studi recenti si è dimostrato che il resveratrolo esercita attività antiproliferativa e antitumorale in diverse linee cellulari tumorali murine ed umane, in modelli di tumore della pelle, del colon, della mammella e della prostata sia *in vitro* che *in vivo*. Tuttavia l'efficacia di questa molecola è largamente dibattuta perché i suoi effetti sono diversi a seconda delle dosi, dei tempi del trattamento e del fenotipo cellulare.

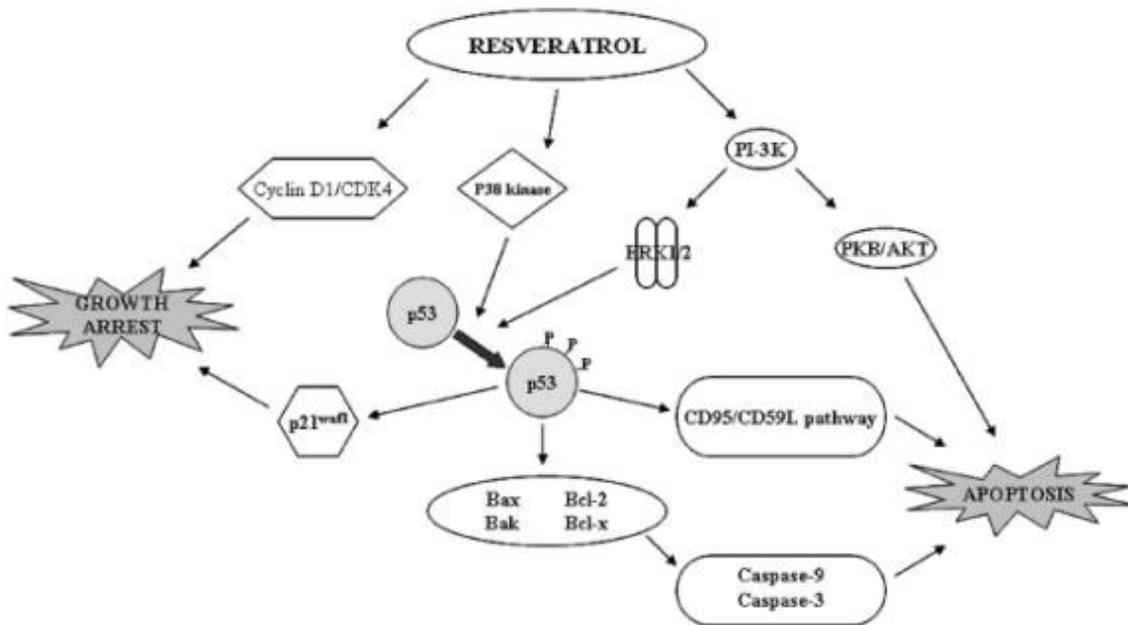


FIGURA 7. Meccanismo molecolare dell'induzione di arresto della crescita ed apoptosi indotte dal resveratrolo.

Il resveratrolo è stato studiato in questo senso, come sostanza veicolata in idonee forme farmaceutiche, come agente complementare alla terapia classica di molti tipi di tumore, promettente speranza futura per la prevenzione ma anche per il trattamento di molti tipi di cancro. Tuttavia, i risultati di questi studi, condotti sia *in vitro* che *in vivo*, non forniscono ad oggi dati certi ma necessitano di ulteriori sperimentazioni sia per quanto riguarda il resveratrolo, che per le differenti tipologie di cancro, sia per quanto riguarda l'aspetto tecnologico-formulativo e farmacocinetico della sostanza.

In studi recenti anche le viniferine, polimeri del resveratrolo presenti nella vite, sono apparsi promettenti come possibili futuri alleati nel trattamento del cancro.

Gli studi *in vitro* e quelli *in vivo* mostrano che il resveratrolo è in grado di legare le COX², coinvolte nella generazione di molecole proinfiammatorie che conducono alla proliferazione del tumore; è inoltre capace di dare sottoregolazione di varie vie metaboliche tutte coinvolte nella riduzione dell'infiammazione e nel prevenire la cancerogenesi come le vie di PKB (protein-chinasi B), MAPK (mitogen-activated protein kinase), NF-kB.

² Ciclossigenasi o prostaglandina-endoperossido sintasi, un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi.

2.2.1 - Studi clinici

Berman *et al.* (2017) hanno compilato una review dei trial clinici dalla quale però emerge che le evidenze sperimentali sull'essere umano sono esigue e incentrate sul problema della bassa biodisponibilità.

I pochi studi clinici condotti mostrano che, sui diversi bersagli all'interno della cellula, l'efficacia dipende dal tipo e dallo stadio del cancro, dai livelli di dosaggio e dai periodi di trattamento.

Segue breve riassunto degli studi sull'essere umano.

Cancro alla prostata

1. Trial di fase 1, studio condotto su 14 pazienti della durata variabile tra 2 e 31 mesi a seconda del paziente. Utilizzo di bucce di uva moscardina polverizzate contenenti 4,4 µg di resveratrolo ogni 500 mg di polvere. Dosaggi variabili: 500 mg, 1000 mg, 2000 mg, 3000 mg, 4000 mg. Osservato un allungamento dei tempi di ricaduta (inteso come allungamento del PSADT, ovvero il PSA³doubling time).

2. Trial clinico randomizzato e controllato a sito singolo su 66 pazienti della durata di 4 mesi. Dosaggi: 150 mg/die o 1000 mg/die. Osservati decremento dei livelli di aldosterone, deidroandrosterone (DHEA) e DHEA solfato. Nessun effetto sulla dimensione della prostata e sui livelli di PSA. Nessun beneficio evidenziato.

Cancro al colon

1. Trial di fase 1 randomizzato, controllato e in doppio cieco su 9 pazienti della durata di 14 giorni (precedenti all'intervento chirurgico). Dosaggio: 5,0 g di SRT501 (forma di veicolazione del resveratrolo, micronizzato somministrabile oralmente per aumentarne la biodisponibilità). Osservato un aumento della caspasi-3 (effettrice di apoptosi).

2. Studio condotto su 20 pazienti della durata di 8 giorni (precedenti alla chirurgia). Dosaggio: 500 o 1000 mg. Osservata riduzione nella proliferazione delle cellule tumorali, indicata da una diminuzione dell'antigene Ki-67⁴.

Mieloma multiplo

Trial clinico di fase 2 condotto su 24 pazienti, durata di circa 4 mesi. Dosaggio: 5,0 g di SRT501. Nessun effetto rilevato, nessun beneficio ma reazioni avverse gravi (più frequentemente insufficienza renale).

³ PSA: glicoproteina con funzione di proteasi serinica, prodotta dalle cellule epiteliali degli acini e dei dotti della ghiandola prostatica.

⁴ Proteina nucleare strettamente associata con la proliferazione cellulare.

Carcinoma alla mammella

Trial clinico randomizzato, controllato, in doppio cieco su 39 pazienti della durata di 3 mesi. Dosaggio: 5 o 50 mg due volte al dì. Osservata una diminuzione della metilazione di RASSF-1 α .

2.2.2- Resveratrolo come fitoestrogeno

Strutturalmente alcuni polifenoli somigliano agli estrogeni: esistono infatti evidenze che alcuni di essi possano comportarsi da agonisti o antagonisti dei recettori degli estrogeni (ER) come per esempio la quercetina (flavonolo) e la genisteina (isoflavone). Anche il resveratrolo presenta una somiglianza con il dietilstilbestrolo (in FIGURA 8), estrogeno di sintesi, che ha suggerito una possibile attività come fitoestrogeno.

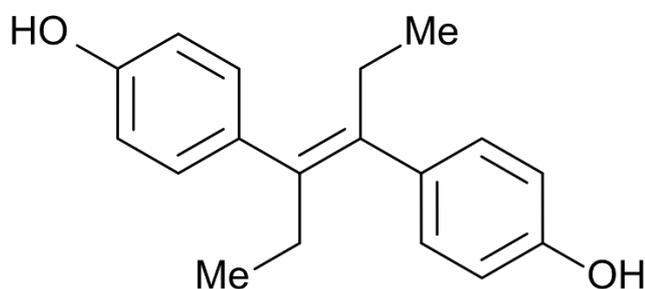


FIGURA 8. Dietilstilbestrolo.

Uno studio dettagliato di Lu R, Serrero G. *et al.* (1999) conferma l'ipotesi: a basse concentrazioni il resveratrolo si comporta da agonista parziale del recettore per gli estrogeni mentre a concentrazioni più elevate e in presenza dell'ormone endogeno la molecola si comporta come antagonista del 17- β -estradiolo.

Per concludere il discorso sulle potenzialità del resveratrolo come fitoestrogeno, segue un esempio. Gli estrogeni sono importanti per la crescita e lo sviluppo del normale tessuto mammario umano. La presenza di estrogeni, tuttavia, è anche un requisito per la crescita e lo sviluppo della maggior parte dei tumori alla mammella. Gli enzimi EST⁵, la cui funzione è inattivare gli estrogeni⁶ legandoli a gruppi solfato, sono molto espressi nelle cellule epiteliali mammarie umane, ma con un'espressione molto bassa o assente nelle carcinose. Un'elevata espressione di EST, che può essere stimolata anche dal progesterone, comporta una diminuzione dei livelli di estrogeni e un effetto protettivo. Quindi i processi biologici che influenzano la disponibilità intracellulare degli estrogeni verso i loro recettori influenzeranno quindi la progressione del cancro alla mammella. Il resveratrolo

⁵ Estrogeno-sulfotransferasi.

⁶ Alta specificità per estradiolo ed estrone.

può essere coniugato a un gruppo solfato in posizione 4' anche da SULT1A1 nelle cellule del cancro alla mammella, in particolare nelle tipologie estrogeno-dipendenti: questo avviene esclusivamente nelle cellule cancerose perché le cellule sane presentano soltanto l'isoforma SULT1E1. Il resveratrolo funge da substrato per SULT1A1 con affinità superiore a quella dell'estradiolo e viene solfato al suo posto (con IC₅₀⁷ fino a 1 M) con un meccanismo di agonismo competitivo nelle cellule tumorali prive di estrogeno-sulfotransferasi. Le potenzialità del resveratrolo-4'-solfato risultano quindi estremamente interessanti per future applicazioni terapeutiche.

Questi e altri studi giustificano la necessità di ulteriori studi che approfondiscano i meccanismi d'azione del resveratrolo, dei suoi metaboliti, delle reazioni avverse e della sua biodisponibilità, la quale rappresenta uno dei principali ostacoli nel suo utilizzo. A perorare la causa anche il vastissimo numero di studi preclinici che forniscono risultati promettenti nell'uso del resveratrolo come chemioterapico o nella prevenzione dei carcinomi.

2.3 - Malattie del sistema cardiovascolare e potenzialità del resveratrolo

Alla luce delle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, è stata presa in considerazione la possibilità che il resveratrolo potesse avere un ruolo protettivo nei confronti del sistema cardiovascolare.

Dagli studi sull'essere umano, secondo Berman *et al.* (2017), risulta che il resveratrolo migliora le funzioni ventricolari di sinistra, sia la sistole che la diastole. Inoltre è dimostrato migliorare anche la dilatazione flusso-mediata, il che aiuta a preservare la corretta funzionalità endoteliale.

Il trattamento con resveratrolo ha mostrato un'inibizione della capacità di aggregazione piastrinica e dei livelli di colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (LDL); inoltre il resveratrolo è in grado di diminuire l'espressione delle ICAM (molecole di adesione cellulare intercellulare), delle VCAM (molecole di adesione cellulare vascolare), e dell'interleuchina 8, tutte molecole promotrici di infiammazione e del deposito di lipidi lungo l'endotelio vascolare, principali cause dell'aterosclerosi.

Questi dati fanno riporre nella molecola elevate aspettative per possibili utilizzi futuri nella prevenzione di questo disturbo: uno studio clinico di Tomé-Carneiro *et al.* (2012) della durata di un anno che prevedeva la somministrazione di un integratore a base di uva (contenente quindi resveratrolo) sembra confermare questi risultati.

Nei fumatori il trattamento con resveratrolo riduce i livelli di infiammazione sistemica nelle vie aeree e diminuisce il rilascio della CRP (proteina C-reattiva) dal fegato.

⁷ IC₅₀ o concentrazione inibente è la concentrazione di un inibitore enzimatico necessaria per inibire il 50% del bersaglio in esame.

Nel complesso, il resveratrolo ha dimostrato effetti positivi negli studi di varie condizioni cardiovascolari, tuttavia altri trial clinici hanno condotto a risultati discordanti. Ancora una volta sono necessarie ulteriori ricerche per verificare l'efficacia nell'uomo del resveratrolo come agente protettivo del sistema cardiovascolare.

2.4 - Trattamento del diabete

Il diabete mellito è una delle patologie con la frequenza più in crescita a livello mondiale. Si rende quindi necessario ricercare altre terapie più sicure, più nuove e più convenienti per combatterne la crescente diffusione, sia per quello che concerne la gestione della malattia che per quanto riguarda la sua prevenzione.

Nei modelli murini, il resveratrolo ha dimostrato di riuscire a sovraregolare la produzione di GLP-1 (glucagon-like peptide) e di poter abbassare la glicemia. Tuttavia, dato il limitato numero di studi clinici, le dimensioni limitate del campione e i risultati contrastanti, nell'essere umano l'efficacia del resveratrolo sull'essere umano rimane ambigua.

In uno studio del 2012 Jayesh *et al.*, che ha previsto la somministrazione di 250 mg/die di resveratrolo in associazione ai farmaci ipoglicemizzanti, è stato dimostrato un significativo incremento dell'emoglobina glicata (HbA1c), della pressione sistolica, del colesterolo totale e delle proteine totali nei pazienti diabetici in 3 mesi. È stato anche riportato che il resveratrolo attiva potenzialmente la sirtuina-1 deacetilasi NAD-dipendente (SIRT1), producendo effetti benefici sull'omeostasi del glucosio e aumentando la sensibilità all'insulina.

Il resveratrolo si è dimostrato utile anche nella prevenzione della nefropatia diabetica⁸. Uno studio che ha coinvolto 6 pazienti con diabete di tipo 2 e albuminuria, a cui venivano somministrati 500 mg/die di resveratrolo, ha mostrato una diminuzione dell'escrezione urinaria di albumina grazie al potere antiossidante della sostanza, poiché i livelli sierici di SOD, GSH-perossidasi, CAT e NO erano pressoché invariati.

In questo campo anche sull'animale da esperimento sono stati ottenuti alcuni risultati rilevanti nell'utilizzo del resveratrolo come nefroprotettivo.

Nel ratto diabetico l'associazione con la rosuvastatina ha mostrato una normalizzazione di TGF- β , NF-kB, SIRT-1.

Higashi *et al.* (2018) hanno utilizzato 10 o 30 mg/die come integrazione nell'acqua di animali diabetici con formazione di cataratta. Esso è stato in grado di ridurre significativamente la

⁸ Consiste nella sclerosi e nella fibrosi glomerulari causate dalle alterazioni metaboliche ed emodinamiche del diabete mellito.

progressione della cataratta, sopprimendo l'aumento delle proteine carbonilate. Questo avviene grazie all'attenuazione del danno ossidativo sul cristallino.

Ancora, nel ratto diabetico con malattia coronarica è stato dimostrato che il resveratrolo preserva il tessuto pancreatico riducendo i livelli di glucosio e trigliceridi, agendo a livello di TLR4, la proteina MyD88 e NF- κ B.

2.5 - Malattie neurologiche

Malattie neurologiche come il morbo di Alzheimer (AD) e l'ictus ischemico agiscono all'interno del SNC attraverso danni di natura ossidativa e di natura infiammatoria: gli studi *in vivo* e *in vitro* sulle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie candidavano il resveratrolo come molecola promettente. Gli studi clinici hanno confermato le ipotesi.

Inoltre, il resveratrolo è noto per modulare le attività di AMPK, SIRT1 e PGC-1 α , regolatori metabolici di cui è stato dimostrato il coinvolgimento nell'insorgenza dei disturbi neurologici. Per esempio, è stato dimostrato che una dieta ipocalorica previene l'insorgenza dei disordini neurologici; la restrizione calorica attiva la deacetilasi SIRT1, verso la quale anche il resveratrolo ha dimostrato attività agonista.

Morbo di Alzheimer (AD)

Nel caso dell'AD gli studi clinici sull'effetto del resveratrolo, sebbene scarsi, in fase 2 hanno mostrato sia la sicurezza nell'uso del fitoterapico nei pazienti con Alzheimer da medio a moderato, sia il suo effetto su alcuni biomarcatori di interesse. Per esempio, pazienti trattati con il resveratrolo per un anno, rispetto al placebo, hanno mostrato livelli di MMP-9⁹ minori. La diminuzione di questa metalloproteinasi indicherebbe la capacità del resveratrolo di potenziare il SNC, riducendone la permeabilità e quindi la capacità dei mediatori proinfiammatori di raggiungere il cervello. Inoltre, i pazienti trattati con resveratrolo hanno mostrato un declino della β -amiloide nel fluido cerebrospinale, e di conseguenza un minore accumulo di A β nel cervello.

Nonostante sia stato dimostrato che il resveratrolo viene metabolizzato rapidamente, limitandone la biodisponibilità, sono state ritrovate quantità significative di resveratrolo e di suoi metaboliti nel fluido cerebrospinale, indice della sua capacità di attraversare con successo la barriera emato-encefalica (BEE).

⁹ Classe di enzimi che appartengono alla famiglia delle zinco-metalloproteinasi coinvolte nella degradazione della matrice extracellulare.

Ictus ischemico

Nel trattamento dell'ischemia cerebrale il farmaco di elezione è l'attivatore tissutale del plasminogeno ricombinante rt-PA che, per essere pienamente efficace deve essere somministrato entro tre ore dall'onset dell'ictus. È stato dimostrato che il trattamento con rt-PA effettuato in ritardo causa una sovraregolazione delle MMP.

Come appena spiegato nel caso dell'AD, anche in questo caso il resveratrolo è in grado di ridurre i livelli di MMP-9 e MMP-2, diminuendo la permeabilità della BEE e ostacolando l'ingresso nel SNC. In uno studio di Chen *et al.* (2016), pazienti che avevano avuto un ictus con un onset definito sono stati trattati con il resveratrolo in associazione a rt-PA. Il risultato ottenuto mostra migliori risultati del trattamento grazie all'interazione del resveratrolo con le metallopeptidasi e quindi un allungamento della ristretta finestra terapeutica di rt-PA.

Questi studi clinici quindi confermano l'efficacia del resveratrolo nel trattamento di queste due diffusissime patologie neurologiche e forniscono spunti per futuri studi clinici atti ad ampliare il campo di applicazione di questa sostanza nell'ambito della neurologia. L'efficacia nel ridurre i marcatori di malattie come AD e ictus mostra inoltre, in questo caso, che la biodisponibilità del resveratrolo è sufficiente all'azione terapeutica senza la comparsa di reazioni avverse.

2.6 - Patologie epatiche

La steatosi epatica è una delle malattie croniche più diffuse al mondo e si presenta spesso in correlazione all'obesità: infatti è indotta principalmente dall'accumulo di trigliceridi a livello degli epatociti. Il peggioramento progressivo di questa condizione può indurre alla cirrosi epatica e i danni agli epatociti sono simili a quelli indotti dall'abuso di alcol. La sigla inglese con cui si identificano queste condizioni infatti è NAFLD, ovvero non-alcoholic fatty liver disease.

Dal punto di vista biochimico questa condizione è caratterizzata da:

- inattivazione di AMPK
- accumulo di lipidi epatici
- ridotta sensibilità all'insulina
- infiammazione.

Poiché è stato dimostrato che il resveratrolo ha proprietà antinfiammatorie, è capace di attivare SIRT1 e di imitare gli effetti di una restrizione calorica, è stata formulata l'ipotesi che quest'ultimo potesse risultare utile nel controllo della progressione dei danni epatici e nel trattamento delle NAFLD.

L'analisi degli studi clinici controllati con placebo indica che il trattamento con basse dosi di resveratrolo per breve tempo nei pazienti ha causato una diminuzione dei livelli di ALT e AST, un

aumento del metabolismo lipidico e una diminuzione dei livelli di infiammazione e glucosio Chen *et al.* (2015) e Zang *et al.* (2016). Questi risultati in particolare sono stati ottenuti con un dosaggio di 300 mg di resveratrolo per 3 mesi; dosi maggiori (3000 mg per 8 settimane e 1500 mg per 6 mesi) non hanno invece mostrato alcun tipo di effetto utile, secondo Chachay *et al.* (2014).

Questi studi sembrano dimostrare che il resveratrolo potrebbe essere un trattamento promettente per i pazienti con NAFLD, risultato che potrebbe migliorare se abbinato ai principali cambiamenti dello stile di vita raccomandati in questo tipo di patologie (come dieta ed esercizio fisico). Tuttavia, non è possibile trarre conclusioni definitive fino a quando continueranno a scarseggiare gli studi clinici e fintanto che quelli esistenti sono insufficienti in termini di varietà dei dosaggi, di durata e dei contesti di trattamento.

La **FIGURA 9** riassume graficamente i meccanismi con i quali il resveratrolo esplica le attività descritte finora.

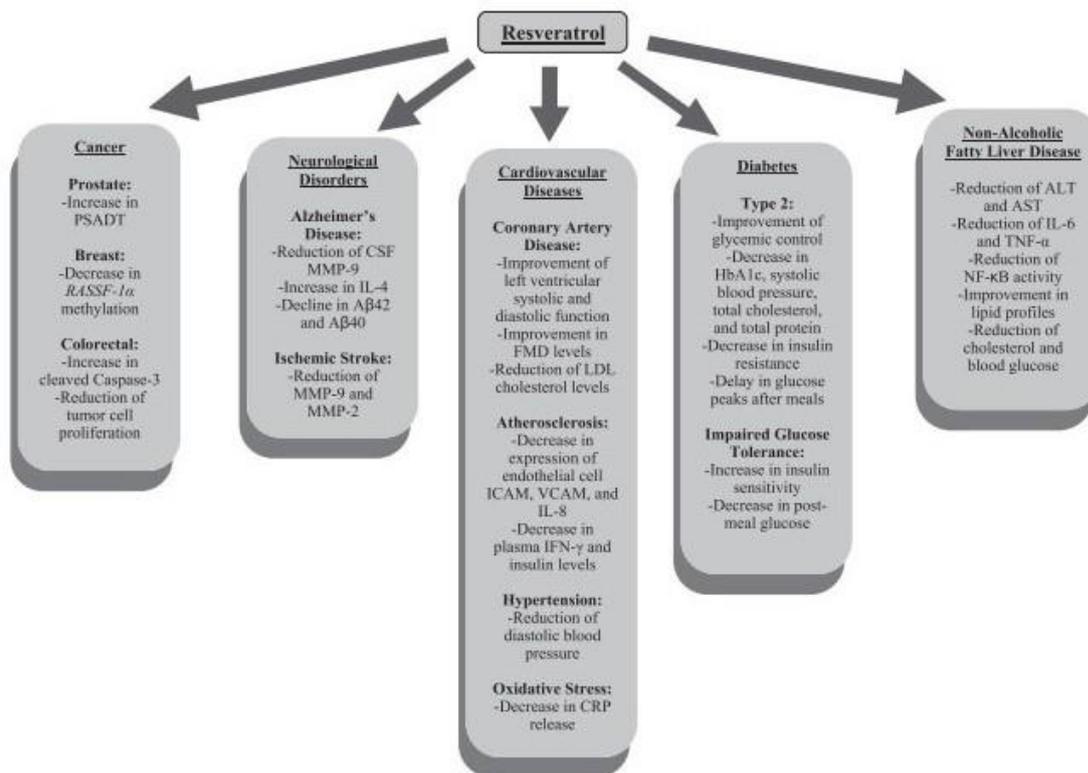


FIGURA 9. Benefici clinici del resveratrolo (Berman *et al.*, 2017).

2.7 - Utilizzo del resveratrolo nella dermocosmesi

L'invecchiamento cutaneo consiste in due processi distinti: il primo è l'invecchiamento intrinseco o crono-invecchiamento che affligge gli organi interni e la pelle nella stessa maniera. Il secondo è l'invecchiamento estrinseco o foto-invecchiamento che si manifesta sulla pelle come risultato di fattori esterni e influenze ambientali come inquinamento, privazione del sonno, esposizione al sole e quindi ai raggi UV ma anche fumo e malnutrizione. I segni clinici dei due tipi di invecchiamento differiscono significativamente tra loro ma i meccanismi cellulari e molecolari alla base del danno alla pelle sono simili. Infatti, l'invecchiamento cutaneo è favorito dall'incremento di specie reattive dell'ossigeno *in situ*, che possono derivare sia da una disturbata funzione mitocondriale che da risposte a stress derivanti per esempio dalla radiazione solare. Il risultato è la diminuzione progressiva dei meccanismi di difesa come per esempio gli antiossidanti endogeni.

La spiccata funzione antiossidante del resveratrolo, paragonabile a quella dell'acido ascorbico, risulta estremamente affascinante ai produttori di cosmetici e infatti esistono una miriade di prodotti come creme, sieri e tonici ma anche integratori alimentari che sfruttano le sue proprietà.

La possibilità di utilizzare non solo la molecola ma anche l'estratto naturale della pianta che la contiene aumenta anche l'appeal del prodotto cosmetico che può vantare tra i claim di marketing la confortante idea di "naturale" come benefico, sano ed ecologico.

Studi *in vivo* e *in vitro* dimostrano l'efficacia sulla cute del resveratrolo sia per quanto riguarda le sue proprietà antiossidanti dirette che per quanto riguarda la sua capacità di sovraregolare le vie endogene dei meccanismi antiossidanti.

2.8 - Il resveratrolo come antivirale

Una delle attività meno conosciute del resveratrolo è quella antivirale. Esiste una certa quantità di studi che attestano come la molecola risulti efficace nel trattamento di molte infezioni virali sia dell'essere umano sia in campo veterinario.

Un articolo di Abba *et al.* del 2015 riporta i dati delle sperimentazioni su diverse tipologie di virus con risultati che mostrano quasi sempre remissioni notevoli dell'infezione virale.

Nel dettaglio i virus considerati sono:

- il virus dell'influenza
- il virus dell'epatite C
- virus respiratorio sinciziale (VRS)
- varicella herpes zoster
- virus Epstein-Barr (agente eziologico della mononucleosi infettiva)
- gli herpes simplex virus 1 e 2
- il virus dell'immunodeficienza umana
- il virus della peste suina africana
- Enterovirus-71
- il metapneumovirus umano
- il virus dell'enterite
- Anatid alphaherpesvirus 1 (AnHV-1).

Lo studio riporta come il potenziale antivirale del resveratrolo non sia direttamente associato all'attività antiossidante della molecola ma l'inibizione della proliferazione virale è associata piuttosto alla capacità del resveratrolo di inibire la sintesi proteica e l'espressione genica virali a vari livelli.

Alcuni meccanismi come esempi sono riportati in seguito.

Virus influenzale

Il resveratrolo è in grado di bloccare attivamente la traslocazione dal nucleo al citoplasma delle ribonucleoproteine virali nelle cellule MDCK¹⁰, diminuendo così l'espressione delle proteine codificate da geni tardivi correlate alla via delle chinasi PCK.

Virus Epstein-Barr

È responsabile della mononucleosi infettiva e coinvolto nella genesi di alcuni tumori epiteliali e di alcuni tipi di linfoma. Il trattamento resveratrolo si è dimostrato capace di:

- ridurre la formazione di papillomi del 60% dopo 20 settimane dall'inoculazione nel modello murino;
- inibizione del ciclo litico per inibizione della trascrizione di geni e proteine
- inibizione dell'attività degli attivatori trascrizionali promotori BRLF1 e BZLF1
- inibizione della sintesi delle proteine, riduzione della produzione di ROS e inibizione della trascrizione dei fattori NF- κ B e AP1.

Herpes simplex virus

Il resveratrolo inibisce la replicazione sia di HSV-1 che di HSV-2 in maniera dose-dipendente e reversibile. Inoltre ritarda l'interfase del ciclo cellulare e previene la riattivazione del virus nei neuroni che ospitano il virus in forma latente.

Virus sinciziale respiratorio

È la causa principale della bronchiolite e della polmonite nei bambini di età inferiore ai due anni, non esistono ad oggi farmaci specifici. Gli effetti del resveratrolo osservati in questo caso sono:

- riduzione dell'infiammazione e dei livelli di interferoni γ ;
- parziale riduzione della replicazione virale e decremento della produzione; dell'interleuchina 6;
- miglioramento della risposta infiammatoria nelle vie respiratorie;
- diminuzione delle cellule proinfiammatorie;
- incremento della produzione di TNF e IL-2.

HIV

In questo caso si sono dimostrati più efficaci i derivati del resveratrolo e l'associazione resveratrolo + decitabina¹¹. Il risultato del trattamento è l'inibizione della sintesi del DNA durante la fase di trascrizione inversa del ciclo vitale virale.

¹⁰ Madin-Darby Canine Kidney, modello di cellule mammifere di derivazione canina.

¹¹ Nucleoside utilizzato nel trattamento delle sindromi mielodisplastiche e per la leucemia mieloide acuta.

Virus dell'epatite C e sclerosi multipla

In questo caso il resveratrolo è ha mostrato di aumentare la replicazione del HCV *in vitro* e addirittura la capacità di esacerbare i segni clinici e istologici nei modelli murini di sclerosi multipla indotta da TMEV¹².

2.8.1 - Resveratrolo e COVID19

Uno studio condotto da Lin *et al.* (2017) mette in luce il resveratrolo come promettente possibile antivirale contro i coronavirus MERS (MERS-CoV).

Nel 2020, con lo scoppio della pandemia da SARS-CoV-2, il resveratrolo, dopo analisi di molecular modeling, viene segnalato come possibile sostanza promettente per lo sviluppo di farmaci contro il COVID-19 (Ranjbar *et al.* 2020).

Uno studio del 2021 condotto in pazienti con malattia lieve da COVID-19, di McCreary *et al.*, randomizzato in doppio cieco e controllato con placebo mostra che nel gruppo a cui è stato somministrato RESV l'incidenza di ricoveri ospedalieri è inferiore, così come diminuisce anche l'incidenza di polmoniti rispetto al gruppo placebo.

La letteratura scientifica a riguardo è ancora agli albori: PudMed mostra circa un centinaio di risultati nella ricerca dei termini “resveratrol” e “covid-19”. Basandosi su quanto ad oggi è noto possiamo affermare che tra tutte le formulazioni a base di resveratrolo e quelle a base di derivati dello stilbenoide, è la molecola immodificata a mostrare maggiore affinità verso la proteina spike S1 del capsido virale.

Sarà certamente approfondito da ulteriori studi in futuro l'effettivo potenziale del resveratrolo non solo nel trattamento della malattia da COVID-19 nei pazienti positivi e sintomatici ma nell'eventualità di un utilizzo profilattico nei pazienti appena esposti al virus.

2.9 - Alcune considerazioni sulle attività

La maggior parte degli studi biologici sulle attività biologiche del resveratrolo sono stati condotti *in vitro*, cioè utilizzando modelli standardizzati di tessuto, cellule o frazioni subcellulari. Quando si ripropongono tali studi *in vivo* su modelli animali, tuttavia, è più difficile dimostrare gli stessi effetti biologici. Le prove dell'efficacia del resveratrolo nell'uomo *in vivo* sono ancora più sfuggenti; infatti, non esiste ancora nessuno studio effettivamente convincente che non rimandi alla necessità di ulteriori approfondimenti. Uno dei motivi principali delle discrepanze tra *in vitro/in vivo* è probabilmente la bassa biodisponibilità di resveratrolo *in vivo*, in particolare dopo somministrazione orale. Dunque le

¹² Virus dell'encefalomielite murina di Theiler.

concentrazioni di resveratrolo finora ottenute nei potenziali siti di azione tissutali o cellulari sono inadeguate a dimostrare chiaramente l'efficacia nell'essere umano.

3 - FARMACOCINETICA E BIODISPONIBILITÀ DEL RESVERATROLO

3.0 - Introduzione

In questo capitolo si analizzeranno i parametri farmacologici fondamentali del resveratrolo come assorbimento, distribuzione, metabolismo, eliminazione (riassunti in **FIGURA 10**) ma soprattutto si introdurrà il problema della sua bassa biodisponibilità.

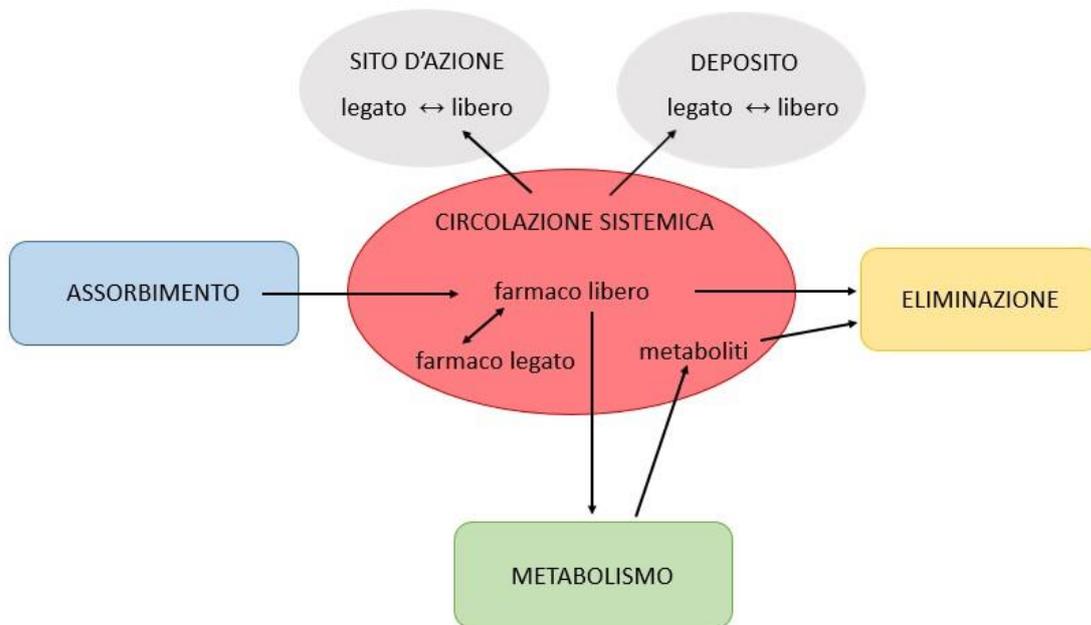


FIGURA 10. Farmacocinetica di uno xenobiotico introdotto nell'organismo.

La biodisponibilità è un parametro farmacocinetico fondamentale che dipende dalla via di somministrazione e dalle caratteristiche proprie della molecola per la quale il parametro si vuole calcolare. Per quanto riguarda la via di somministrazione orale, possiamo definire la biodisponibilità come quel valore che indica la velocità e la quantità di principio attivo che viene assorbito da una forma farmaceutica e raggiunge immutato il circolo sistemico.

La biodisponibilità si può misurare nel tempo e nella quantità: inserendo i dati in un diagramma cartesiano con in ascissa il tempo trascorso dalla somministrazione e in ordinata la concentrazione plasmatica dello xenobiotico in esame, si ottiene una curva caratteristica per ciascuno xenobiotico e l'area sottesa dalla curva (AUC) diventa una manifestazione grafica della biodisponibilità. (**FIGURE 11 e 12**).

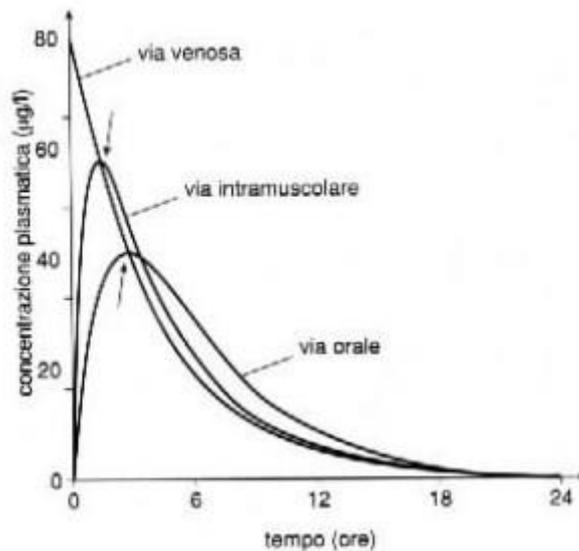


FIGURA 11. Andamento delle concentrazioni plasmatiche dello stesso farmaco somministrato attraverso diverse vie di somministrazione.

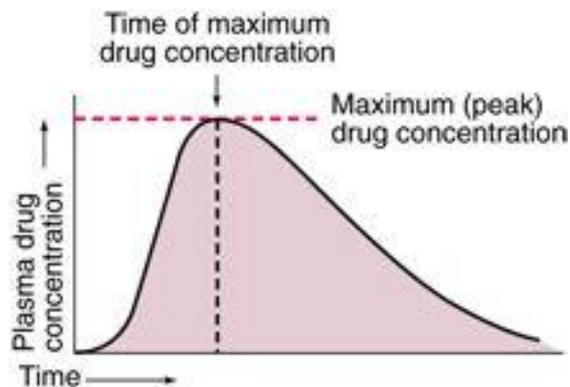


FIGURA 12. Esempio grafico del concetto di AUC.

Il concetto di biodisponibilità si può applicare a ogni via di somministrazione ottenendo curve diverse che permettono di confrontare i risultati di somministrazioni attraverso diverse vie per lo stesso xenobiotico ma anche di due molecole differenti con la stessa via di somministrazione.

La concentrazione di resveratrolo, sia nel vino rosso che negli altri alimenti in cui è presente è molto bassa, ragion per cui il potenziale effetto attribuito a questo composto è stato spesso criticato. Gli studi sulla biodisponibilità e sulla metabolizzazione del resveratrolo, e dei polifenoli in generale, sono quindi importanti per chiarire i presupposti indispensabili, ovvero se le concentrazioni che si raggiungono nell'organismo dopo assunzione orale siano sufficienti a spiegare gli effetti salutistici ad essi attribuiti; questi studi sono tuttora incompleti.

Un'ulteriore precisazione importante è sottolineare che la materia necessita di ulteriori studi futuri per quanto riguarda le differenze di metabolizzazione dei due stereoisomeri del resveratrolo, ma anche i numerosi stessi metaboliti. Una volta sciolti questi nodi, sarà necessario anche capire

come i diversi genotipi e fenotipi farmacogenetici influenzano la farmacologia di questa promettente molecola.

3.1- Assorbimento

L'assorbimento, per definizione farmacologica, consiste nel trasferimento del principio attivo dal sito primario di introduzione nell'organismo al torrente circolatorio e quindi:

- implica il passaggio attraverso le membrane biologiche (che dipende dalle caratteristiche solubilità e lipofilia della molecola);
- è funzione della concentrazione del farmaco, del flusso sanguigno individuale e dell'area della superficie assorbente.

Va specificato che l'assorbimento segue cronologicamente la fase di dissoluzione qualora si stia valutando una forma di veicolazione della sostanza in esame e non la sostanza pura.

Il resveratrolo, a causa della sua struttura chimica, ha una solubilità in acqua inferiore a 0,05 mg/mL: ciò condiziona il suo assorbimento a causa della bassa capacità di dissoluzione, che ne ostacola l'azione biologica soprattutto negli organi più lontani dal tratto gastro-intestinale. Il metodo più semplice e immediato a livello tecnologico per aumentare la solubilità del resveratrolo è utilizzare solventi diversi dall'acqua: per esempio, in etanolo la solubilità aumenta di mille volte (50 mg/mL).

È importante sottolineare anche l'abilità della molecola di formare un'ampia gamma di legami con le altre molecole organiche. I gruppi idrossilici forniscono la possibilità di legare molecole alifatiche che possono migliorare le proprietà farmaceutiche del resveratrolo.

Per avere un buon indice di assorbimento gli xenobiotici hanno bisogno di avere caratteristiche di lipofilità, come il resveratrolo. Per essere assorbito il resveratrolo lega le proteine plasmatiche creando complessi anfifilici che favoriscono il processo.

3.1.1 - Assorbimento e distribuzione del resveratrolo

L'inizio del processo di dissoluzione è la masticazione tramite la saliva, continua con la digestione acida in ambiente gastrico e si conclude con l'inizio della fase di assorbimento nell'intestino tenue.

A livello intestinale circa il 75% del resveratrolo viene assorbito tramite diffusione passiva attraverso gli enterociti o formando complessi con proteine che fungono da carriers come le integrine e infine raggiunge il torrente circolatorio passando attraverso il digiuno e l'ileo. Il resveratrolo può essere trasformato da batteri intestinali come *Slackia equolifacens* e *Adlercreutzia equolifacens* che portano all'idrogenazione dei doppi legami alifatici presenti nella sua struttura, dando il diidroresveratrolo (DHR). Durante questa metabolizzazione presistemica può essere prodotta anche

piceide, una forma glicosilata del resveratrolo, tramite fermentazione ad opera di *Bifidobacteria infantis* e di *Lactobacillus acidophilus*.

Una volta nel circolo sanguigno il resveratrolo si può trovare essenzialmente in tre forme: libero, legato all'acido glucuronico o solfato. La forma libera può legarsi all'albumina e alle lipoproteine come LDL. Questi complessi a loro volta possono venire dissociati a livello delle membrane cellulari che hanno i recettori per albumina e LDL, liberando resveratrolo in forma libera e permettendogli di entrare nella cellula. L'affinità del resveratrolo verso l'albumina suggerisce che questa potrebbe essere una forma naturale di riserva per i polifenoli, giocando un ruolo fondamentale sia nella loro distribuzione che per la loro biodisponibilità.

Per le sue caratteristiche chimiche il resveratrolo è capace di interagire con gli acidi grassi. Recenti studi *in vitro* mostrano che più del 90% del *trans*-resveratrolo in forma libera è legato alle proteine plasmatiche umane. Questi legami si ritrovano anche *in vivo*, come dimostra la presenza di composti polifenolici nelle LDL isolati nei campioni di sangue di volontari sani (Urpí-Sardà *et al.*, 2005). Gli acidi grassi favoriscono la formazione dell'ambiente lipofilo che favorisce il legame del resveratrolo. Infatti normalmente vengono utilizzati come vettori proprio per la loro alta affinità con il tessuto epatico e per l'efficienza del loro uptake cellulare, grazie all'interazione con gli specifici trasportatori transmembrana.

3.1.2 - Influenza del cibo sull'assorbimento

Uno studio di Ramírez-Garza *et al.* (2018) afferma che non vi è alcun aumento dell'assorbimento del *trans*-resveratrolo quando viene consumato con altre sostanze di natura fenolica o con alcol. Tuttavia, se consumato con cibi ricchi di grassi, l'associazione tende a far diminuire la concentrazione plasmatica massima e l'area sotto la curva (AUC): i cibi grassi quindi possono interferire o ritardare l'assorbimento del resveratrolo, influenzando la sua farmacocinetica.

Quando si confronta l'assorbimento di soluzioni acquose dei *trans*-resveratrolo con saccarosio, fruttosio, ribosio, destrosio o xilitolo è stato dimostrato che la soluzione acquosa con ribosio aumenta maggiormente l'assorbimento del resveratrolo. (Blanchard *et al.*, 2014).

Una delle modalità più efficienti per somministrare per via orale il resveratrolo è bere il vino che lo contiene: è necessario sottolineare però che la quantità contenuta nel vino varia notevolmente in base al tipo di vino, al vitigno da cui proviene l'uva, alla metodica di vinificazione ma anche dalla tipologia di terreno, dal clima e molti altri fattori ambientali.

3.1.3 - Assorbimento e biodisponibilità

Nella letteratura scientifica vengono annoverati studi sugli esseri umani che considerano l'assorbimento e la biodisponibilità del resveratrolo dopo la somministrazione orale una tantum di 25 mg di resveratrolo, che corrispondono all'ingestione di una moderata quantità di vino rosso. Nonostante l'uso di metodiche analitiche altamente sensibili e specifiche, è difficile rilevare quantità di resveratrolo non metabolizzato nel plasma. Approssimativamente si stimano picchi di concentrazione minori di 10 nM/mL dopo 0,5-2 ore dalla somministrazione. La stima della quantità totale di resveratrolo e suoi metaboliti è notevolmente superiore: circa 400-500 ng/mL, ovvero circa 2 µM. Questo indica una biodisponibilità orale della molecola libera estremamente bassa in confronto a quella dei suoi metaboliti. (Goldberg *et al.*, 2003; Walle *et al.*, 2004)

La concordanza dei due studi considerati conferma anche la validità delle metodologie di analisi eleggendole tecniche di elezioni per gli studi successivi: l'uso di marker radioattivi abbinati alla cromatografia liquida (LC) così come la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC/MS) o la anche la gascromatografia sempre accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS).

In base all'escrezione urinaria dei metaboliti totali del resveratrolo marcato radioattivamente, è possibile sostenere che l'assorbimento orale del resveratrolo si attesti almeno attorno al 75% della dose.¹³ Ciò si può dedurre anche dal confronto tra la AUC dopo somministrazione orale e quella dopo somministrazione intravenosa, assumendo che il resveratrolo venga metabolizzato nella stessa maniera.

Questa percentuale di assorbimento è molto alta per una sostanza polifenolica, in particolare se associata alla bassa idrofilia. Tuttavia, il dato è coerente con quanto riscontrato anche nei modelli cellulari come Caco-2: una linea cellulare ottenuta da un carcinoma del colon, capace di differenziarsi spontaneamente in un monostrato di cellule con proprietà di assorbimento tipiche degli enterociti con orletto a spazzola dell'intestino tenue umano. In questo modello si è potuto verificare anche che il resveratrolo attraversa gli enterociti per diffusione passiva, mentre i suoi metaboliti utilizzano anche il trasporto attivo.

Sono stati testati diversi approcci per testare la variazione della disponibilità del resveratrolo. L'aumento della dose è stato testato in due studi (Boocock *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2009) usando un range tra i 25 e i 5000 mg, intervallo di dosaggi che rispecchia quello degli studi sull'attività chemiopreventiva della molecola. Dall'osservazione delle curve dose-risposta sembra esserci un aumento lineare della concentrazione plasmatica proporzionale all'aumento della dose, senza

¹³ si veda **TABELLA 4**, sezione **3.2.3 - Eliminazione del resveratrolo**.

evidenze di saturazione e senza evidenze che possano far pensare a possibili pompe di efflusso. Il massimo assorbimento riscontrato con questa metodologia si attesta tra 0,3 e 2,4 μM , concentrazione plasmatica che però non raggiunge quella a cui il resveratrolo mostra le sue capacità anticancerogene (ovvero 5 μM). In FIGURA 13 i risultati degli studi di Boocock e Almeida sopraccitati.

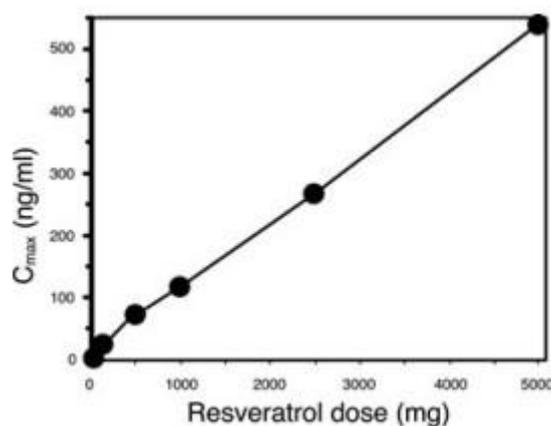


FIGURA 13. Concentrazioni medie di picco plasmatico di resveratrolo (C_{max}) in volontari sani a cui sono state somministrate dosi orali singole da 25 a 5000 mg (Walle T., 2011).

La somministrazione di dosi ripetute nel tempo, ulteriore approccio riportato da Walle *et al.* (2011), potrebbe portare invece alla saturazione del metabolismo dovuta all'alta concentrazione di resveratrolo nel plasma e nei tessuti, situazione osservata solo nell'animale con studi della durata di 15-20 settimane. Inoltre questo studio dimostra come la molecola sia ben tollerata e suggerisce che il momento migliore per la somministrazione è il mattino, in quanto si sono registrati valori più alti di biodisponibilità.

Entrambi gli approcci necessitano però di essere studiati ulteriormente.

3.1.4 - Emivita del resveratrolo

L'emivita è un parametro farmacocinetico che indica il tempo richiesto per ridurre del 50% la concentrazione plasmatica di un farmaco o di uno xenobiotico. È un parametro estremamente interessante che ci permette di capire quanto velocemente una sostanza viene metabolizzata/eliminata dal nostro organismo.

Per comprendere l'emivita del resveratrolo sono stati condotti studi sugli animali a cui è stato somministrato *trans*-resveratrolo puro. In uno studio di Asensi *et al.* (2002) i ricercatori hanno ottenuto i risultati riportati in TABELLA 3, somministrando una dose di *trans*-resveratrolo pari a 20 mg/kg, un dosaggio che, convertito appropriatamente, rappresenta per un uomo adulto circa 140 volte la quantità di resveratrolo presente in un litro di vino rosso.

TABELLA 3. Concentrazioni plasmatiche dopo somministrazione di 20 mg/kg di trans-resveratrolo puro sui topi. Valori ricavati da Asensi *et al.* (2002).

CONCENTRAZIONI PLASMATICHE		
SOMMINISTRAZIONE INTRAGASTRICA	dopo 5 minuti	dopo 60 minuti
	42,8 ± 4,4 µM	0,9 ± 0,2 µM

CONCENTRAZIONI PLASMATICHE		
SOMMINISTRAZIONE ORALE	dopo 5 minuti	dopo 60 minuti
	2-3 µM nei topi 1 µM <u>ca</u> in conigli o ratti	> 0,1 µM

3.2 - Metabolismo ed eliminazione

Il metabolismo di un farmaco o di qualsiasi xenobiotico è un insieme spesso complesso di reazioni. Tutt'al più modificazioni enzimatiche a carico dello xenobiotico che portano alla formazione di altre molecole, dette metaboliti. Il metabolismo può essere precedente e/o successivo alla fase di distribuzione. I meccanismi sono molteplici: a partire dall'azione idrolitica nell'ambiente acido dello stomaco, ma soprattutto si estrinseca attraverso l'azione di specifici enzimi nel fegato e nell'intestino ma anche nei reni, nei polmoni e persino nel plasma e nella pelle.

La funzione farmacologica fondamentale di questa fase è trasformare lo xenobiotico in un composto più polare e quindi più solubile in acqua per favorirne l'eliminazione.

In generale il metabolismo di un farmaco/xenobiotico può portare a risultati molto differenti a causa delle caratteristiche intrinseche di ciascuna molecola:

- disattivazione metabolica: diminuita attività farmacologica;
- attivazione metabolica: aumentata attività farmacologica;
- aumento della tossicità, sia come citotossicità che come carcinogenicità;
- diversa attività farmacologica.

Per quanto riguarda la via di somministrazione orale, in particolare, farmaci e xenobiotici subiscono un metabolismo più o meno importante prima di raggiungere il loro sito d'azione:

- metabolismo di primo passaggio epatico: si dice dei processi enzimatici che interessano lo xenobiotico che viene assorbito dal sistema portale epatico e, se abbastanza lipofilo, che arriva agli epatociti;
- metabolismo presistemico: l'intestino e il microbiota che lo popola sono ricchi di enzimi con azione ossidante e di enzimi che possono trasferire gruppi polari sul farmaco; questo può portare ad una disattivazione del farmaco prima che venga assorbito.

Le reazioni caratteristiche del metabolismo farmacocinetico si possono distinguere in due grandi gruppi: reazioni di fase 1 e reazioni di fase 2.

Reazioni di fase 1 o di funzionalizzazione: comprendono le reazioni di

- ossidazione, catalizzata dagli enzimi della superfamiglia del citocromo P450;
- riduzione;
- idrolisi;

principalmente queste reazioni avvengono a livelli dei microsomi epatici, ma l'idrolisi può avere luogo anche nel plasma.

Reazioni di fase 2 o di coniugazione: la loro funzione è legare gruppi polari alle funzioni chimiche introdotte dalle reazioni di fase 1 o già presenti nella molecola. I derivati così ottenuti sono più solubili in acqua. Comprendono:

- metilazione di ossigeni, azoti e zolfi
- N-acetilazione di ammine primarie
- reazioni di coniugazione con acido glucuronico, gruppi solfato, glutatione e aminoacidi (glicina e glutammina).

Fra tutti i fattori che possono influenzare il metabolismo di uno xenobiotico troviamo: fattori ambientali, fattori fisiologici (sesso, età...), fattori genetici ma anche fattori farmacodinamici (dosaggio, via di somministrazione, distribuzione...) e le interazioni con altri xenobiotici e farmaci.

Al metabolismo è conseguente l'eliminazione, la quale dipende dal carattere polare e dal peso molecolare. La polarità faciliterà l'escrezione tramite il processo di filtrazione glomerulare a livello renale. Le vie predilette sono la via urinaria e l'escrezione fecale, la seconda è favorita per sostanze con pesi molecolari maggiori di 300-500 u.

3.2.1 - Metabolismo ed eliminazione del resveratrolo

Nell'intestino, la solubilità del resveratrolo è fattore limitante per la sua successiva eliminazione. Infatti, per ovviare alla sua scarsa idrofilia, esso viene largamente metabolizzato portando alla produzione di coniugati solfati e glucuronati i quali conservano essi stessi alcune attività biologiche.

Il metabolismo del resveratrolo inizia anche prima dell'assorbimento: si tratta del metabolismo presistemico che produce diidro-resveratrolo e piceatannolo rispettivamente attraverso riduzione del doppio legame uno e idrossilazione l'altro. Questa rapidissima metabolizzazione è la prima responsabile della bassissima percentuale di resveratrolo libero nel sangue e conseguentemente dei bassi valori di biodisponibilità. La quota libera di resveratrolo e dei suoi metaboliti, diidro-resveratrolo e piceatannolo, dall'intestino entrano nel torrente circolatorio e nel fegato dove vengono processati dal CYP450, sperimentando le reazioni di fase 2.

Dagli studi effettuati finora sappiamo che vengono escreti nelle urine cinque metaboliti:

- resveratrolo monosolfato (resveratrolo-4'-solfato)

- resveratrolo-3-*O*-glucoronide
- resveratrolo-4'-*O*- glucoronide
- monosolfato di diidroresveratrolo (7,8-diidroresveratrolo-3-solfato)
- diidroresveratrolo monoglucoronide

La quantità e la tipologia dei metaboliti escreti sono fortemente sottoposte a variabilità interindividuale. Le strutture molecolari sono mostrate in **FIGURA 14**.

Sono stati identificati in campioni di urina umana anche metaboliti del *cis*-resveratrolo: *cis*-resveratrolo-4'-solfato, *cis*-resveratrolo-3-*O*-glucoronide e *cis*-resveratrolo-4'-*O*-glucoronide; secondo uno studio di Wenzel *et al.* (2005) la reazione di coniugazione con acido glucuronico è dalle 5 alle 10 volte più rapida per l'isomero *cis*- rispetto al *trans*-. Va sottolineato inoltre che essendo questo stereoisomero meno presente in natura, perché meno stabile, sono stati condotti una minore quantità di studi anche per quanto riguarda il suo metabolismo.

Coniugazione con acido glucuronico

La coniugazione del resveratrolo con l'acido glucuronico avviene per azione dell'enzima uridina difosfato glucuronosil-transferasi (UGT), in particolare le isoforme UGT1A1 e UGT1A3, ma anche UGT1A8, UGT1A9, e UGT1A10; queste catalizzano il processo di glucuronidazione mediante coniugazione di una molecola acido glucuronico sui gruppi 3-OH o 4'-OH.

In uno studio di Su *et al.* (2019) il cui scopo era valutare l'eliminazione del principale metabolita, il *trans*-resveratrolo-3-*O*-glucoronide somministrato per via orale ha mostrato che la via di eliminazione preferenziale è renale e nelle urine la percentuale quantificata è 52,8%.

Coniugazione con gruppi solfato

Nei tessuti come fegato, reni e cervello il resveratrolo può essere substrato degli enzimi sulfotransferasi (SULT), capaci di coniugare un gruppo solfato. L'isoforma più coinvolta è SULT1A1.

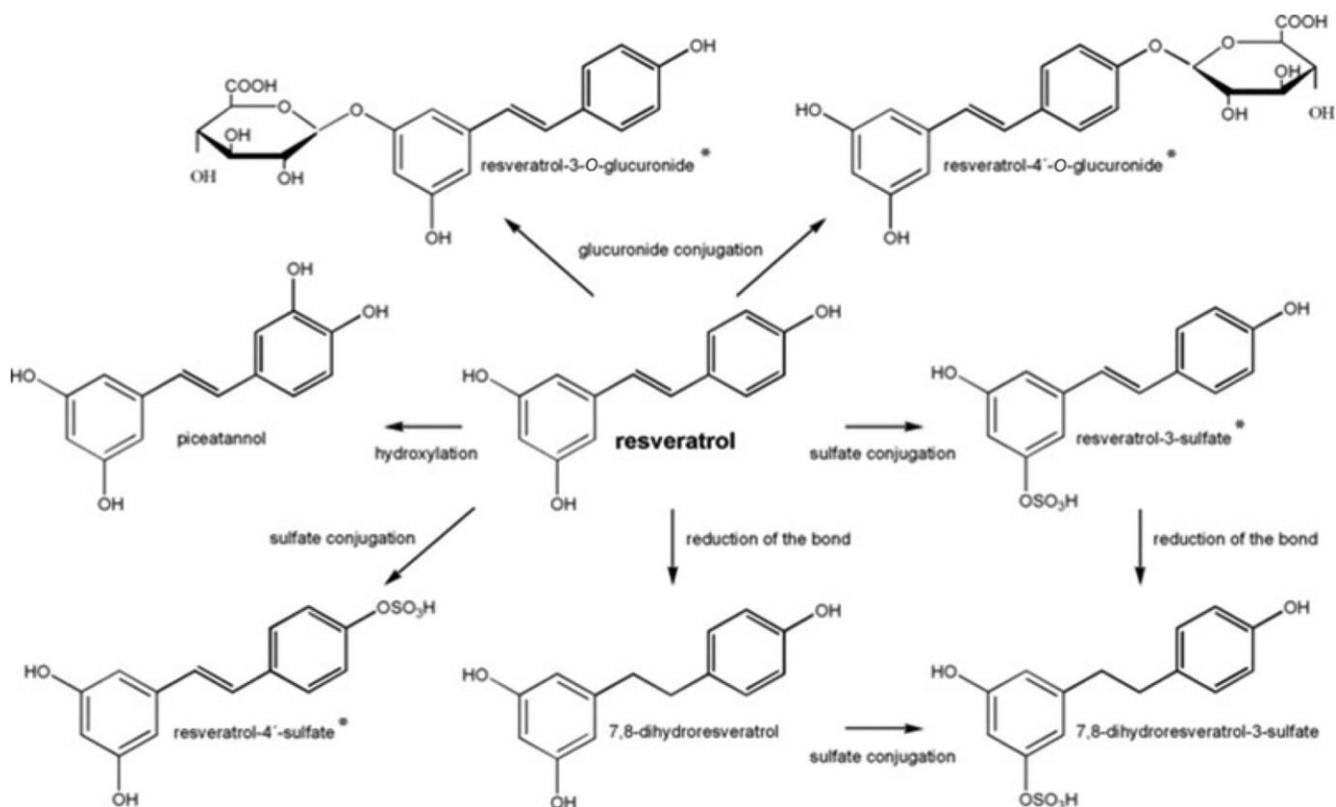


FIGURA 14. Metaboliti del resveratrolo (Riccio *et al.*, 2020).

3.2.2 - Biotrasformazioni ulteriori dei metaboliti del resveratrolo

Nella membrana apicale degli enterociti il resveratrolo viene coniugato come descritto sopra: i metaboliti, non più capaci di diffondere passivamente attraverso l'enterocita, vengono trasportati attivamente per mezzo dei trasportatori BRCP e MRP2; a livello della membrana basolaterale invece vengono traghettati dal trasportatore MRP (FIGURA 15). I coniugati del RESV che giungono nell'intestino crasso sono sottoposti, come la molecola madre, all'azione del microbiota con formazione di diidroresveratrolo e altri metaboliti come 3,4'-*O*-diidrossi-*trans*-stilbene e lunularina.

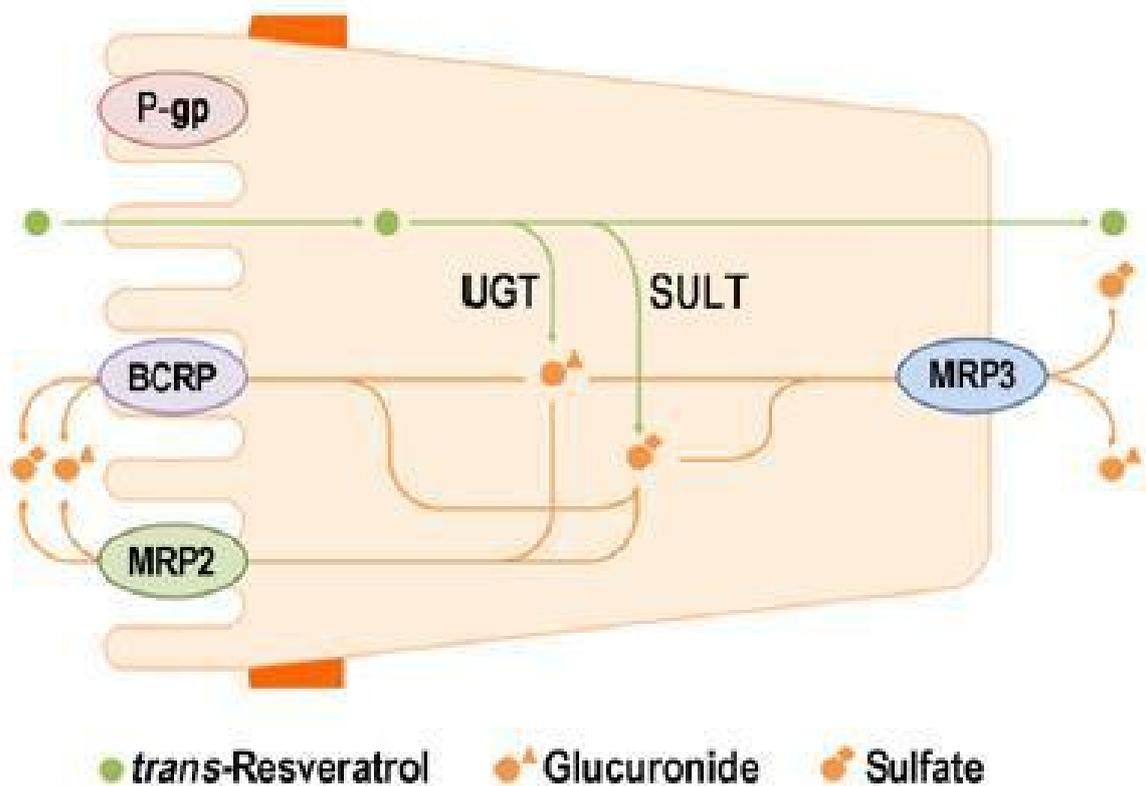


FIGURA 15. Meccanismi di trasporto attraverso l'enterocita del resveratrolo e dei suoi metaboliti solfato e glucuronato.

Superato il passaggio attraverso gli enterociti, i coniugati del resveratrolo entrano nella circolazione portale e giungono al fegato dove possono incorrere in ulteriori biotrasformazioni sia in termini di reazioni di fase 1 che in termini di coniugazioni. I prodotti di questa metabolizzazione entrano a loro volta nel circolo sanguigno per essere assorbiti dai tessuti periferici dove esplicano le loro eventuali attività biologiche. Dopo un ulteriore passaggio epatico anche i metaboliti del resveratrolo arrivano ai reni per essere filtrati ed escreti nell'urina. Tuttavia questi prodotti possono anche raggiungere la bile, ritornando quindi nell'intestino tenue ed essere soggetti nuovamente ad assorbimento o all'eliminazione tramite le feci.

La FIGURA 16 mostra schematicamente il percorso fino a qui descritto del resveratrolo e dei suoi metaboliti, dall'assorbimento all'escrezione renale: il resveratrolo (R) è rappresentato da un cerchio verde, le sigle DHR e L indicano rispettivamente diidroresveratrolo e lunularina; i metaboliti del resveratrolo sono rappresentati con dei quadratini colorati aggiunti al simbolo del resveratrolo: rosso per il solfato (S) e blu per il glucuronato (G).

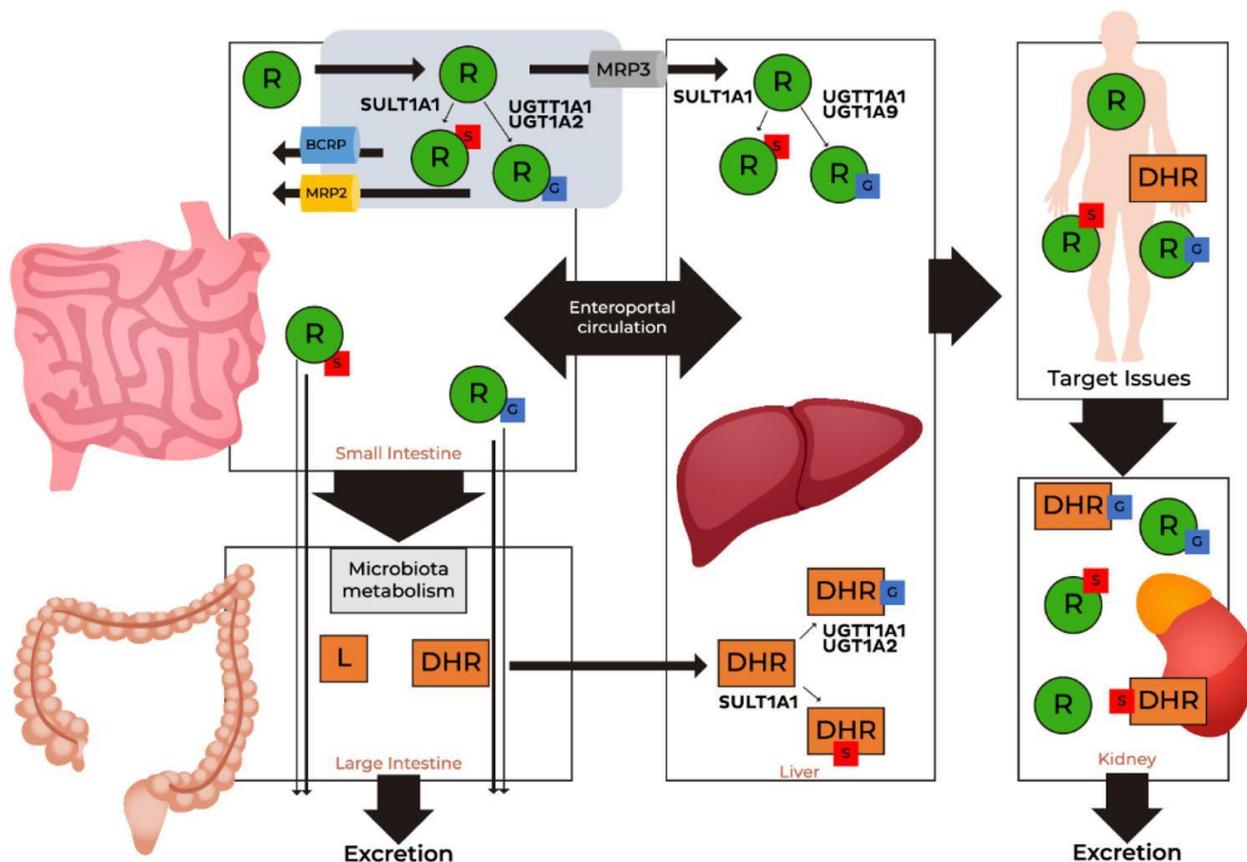


FIGURA 16. Percorso del resveratrolo e dei suoi metaboliti dall'assorbimento all'escrezione renale (Riccio *et al.*, 2020).

3.2.3 - Eliminazione del resveratrolo

Da uno studio di Walle *et al.* (2004), condotto per valutare la biodisponibilità del resveratrolo e dei suoi metaboliti dopo somministrazione orale e intravenosa, sono stati ricavati i seguenti dati, riportati in TABELLA 4.

TABELLA 4. Percentuale della dose di resveratrolo eliminata come tale + metaboliti ritrovati dopo eliminazione nelle due vie principali di escrezione.

	SOMMINISTRAZIONE ORALE	SOMMINISTRAZIONE INTRAVENOSA
ESCREZIONE RENALE	53,4-84,9%	42,3-83,2%
ESCREZIONE FECALE	0,3-38,1%	0,6-22,7%

Si può dedurre che la via preferenziale di escrezione, come anticipato, sia quella renale attraverso l'urina. Gli studi dopo somministrazione orale hanno dimostrato anche che l'escrezione si verifica preferibilmente entro le prime quattro ore dall'ingestione. Inoltre gli autori hanno osservato che della dose somministrata si ritrova sommando le due vie di eliminazione per il 70,5-97,6% dopo somministrazione orale e per il 53,5-91,2% per la via endovenosa. La differenza tra la dose di resveratrolo somministrata e la totalità dei metaboliti ritrovati in sede di eliminazione, che si attesta tra il 2 e il 30%, è dovuta alla distribuzione nei tessuti periferici del resveratrolo.

3.3 - Tossicità e reazioni avverse

A norma del regolamento UE 2015/2283 sui nuovi alimenti, il resveratrolo è inserito nell'elenco allegato di sostanze di cui è consentito l'utilizzo negli integratori alimentari.

Non risultano claim approvati dall'EFSA (l'Autorità europea per la sicurezza alimentare) specifici per i prodotti a base di resveratrolo, ma non sono registrate nemmeno controindicazioni. Anche la Food and Drug Administration statunitense fornisce le stesse indicazioni, riconoscendolo come non tossico sia a livello sistemico che topico nell'arco di 90 giorni.

Più specificatamente, parlando del *trans*-resveratrolo, il regolamento europeo specifica nelle "condizioni alle quali l'alimento può essere utilizzato" un dosaggio massimo di 150 mg/die e delle specifiche da inserire obbligatoriamente nell'etichetta, come riportato dalla **TABELLA 5**.

TABELLA 5. Allegato al REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2021/51 DELLA COMMISSIONE del 22 gennaio 2021 che autorizza una modifica delle condizioni d'uso del nuovo alimento «trans-resveratrolo» a norma del regolamento (UE) 2015/2283 del Parlamento europeo e del Consiglio e che modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2017/2470 della Commissione. Da: <https://eur-lex.europa.eu>

ALLEGATO

Nell'allegato del regolamento di esecuzione (UE) 2017/2470, la voce «Trans-resveratrolo» nella tabella 1 (Nuovi alimenti autorizzati) è sostituita dalla seguente:

Nuovo alimento autorizzato	Condizioni alle quali il nuovo alimento può essere utilizzato		Requisiti specifici aggiuntivi in materia di etichettatura	Altri requisiti	Tutela dei dati
«Trans-resveratrolo»	<i>Categoria dell'alimento specificato</i>	<i>Livelli massimi</i>	1. La denominazione del nuovo alimento figurante sull'etichetta dei prodotti alimentari che lo contengono è «trans-resveratrolo». 2. L'etichetta degli integratori alimentari contenenti trans-resveratrolo deve recare l'indicazione secondo cui il consumo del prodotto in combinazione con medicinali può avvenire soltanto sotto controllo medico.»		
	Integratori alimentari quali definiti nella direttiva 2002/46/CE destinati alla popolazione adulta	150 mg/giorno			

Secondo uno studio di Cottard *et al.* (2009), nessun effetto negativo è stato riportato sino a un dosaggio di 300 mg su kg al di; nello stesso articolo si sostiene che anche l'assunzione cronica di 0,7 mg per chilogrammo di peso corporeo al giorno siano perfettamente tollerati. Sul ratto il resveratrolo non ha mostrato tossicità riproduttiva o embriofetale dopo somministrazione di 250 mg per kg al di per una durata di 3 mesi. Tuttavia i ricercatori riportano un leggero aumento dell'enzima AST

(aspartato aminotransferasi), uno dei marcatori di danno epatico, quando somministrati 20 mg/kg al di nel ratto.

Crowell *et al.* (2004), in un altro studio, hanno notato a dosi più elevate il rischio di nefrotossicità.

Almeida *et al.* (2009) in un altro studio sugli esseri umani, hanno somministrato a 40 volontari una dose di resveratrolo (a dosaggi di 25, 50, 100, 150 mg o placebo) ogni 4 ore per 48 ore. La reazione avversa più frequentemente segnalata è stata il mal di testa frontale (tre casi). Gli altri eventi avversi si sono manifestati solo una volta: cefalea, mialgia degli arti inferiori, sonnolenza (gruppo 25 mg), epididimite (gruppo 100 mg) e vertigini e cefalea occipitale (gruppo 150 mg), senza alcuna chiara relazione con la dose somministrata.

3.4 - Considerazioni sulla biodisponibilità del resveratrolo e la sua influenza nel dosaggio

La biodisponibilità e la farmacocinetica di resveratrolo dipendono dalle dosi ingerite, dall'ingestione concomitante di cibo, dalla forma farmaceutica somministrata, dal microbiota intestinale e dai ritmi circadiani. Va sottolineato inoltre che la biodisponibilità è generalmente caratterizzata dalla quantificazione delle concentrazioni plasmatiche, ma ciò non considera il resveratrolo che è stato distribuito ad altri tessuti. Pertanto, la biodisponibilità potrebbe restituire un'idea non rappresentativa della reale esposizione al resveratrolo dei tessuti come cuore, fegato e muscolo scheletrico. Il dosaggio di un preparato a base di resveratrolo dovrà tenere conto di questo comportamento farmacocinetico.

Riassumendo quanto discusso in precedenza, gli studi suggeriscono che una somministrazione ripetuta e moderata di resveratrolo sia migliore della somministrazione di una singola dose più alta; la dose efficace è di 1 g al giorno, tuttavia è stato mostrato che l'assunzione rimane sicura ad una dose fino a un massimo di 5 g.

La maggior parte dei prodotti commercializzati che contengono resveratrolo risulta comunque assolutamente ipodosata: sulla base delle conoscenze attuali un dosaggio adeguato di resveratrolo corrisponderebbe circa a 150 mg/die, gli integratori attualmente in commercio ne contengono circa 20 volte di meno.

Il comportamento del resveratrolo dopo assunzione orale è particolarmente curioso: è assorbito addirittura fino al 75% nell'uomo, ma solo l'1% si trova libero e solo questa quota può essere considerata attiva; si cerca quindi da anni di incrementare il rapporto tra forma libera e forma coniugata, oggi è di circa 1:20. Nel capitolo seguente si tratterà degli approcci tecnologici finora sperimentati per ovviare a questo problema.

4 - TECNICHE MIGLIORATIVE DELLA BIODISPONIBILITÀ DEL RESVERATROLO

4.0 - Introduzione

Per amplificare l'effetto biologico di una sostanza l'approccio più elementare è aumentare la dose somministrata. Tuttavia aumentare l'effetto biologico non sempre ha un significato positivo. Infatti, soprattutto con i farmaci ma anche con i fitoterapici, spesso aumentare il dosaggio significa incorrere in reazioni avverse e tossicità di varia natura.

Aumentando il dosaggio, aumenta anche la biodisponibilità e quindi la quota di farmaco effettivamente utile all'effetto terapeutico. Nell'ottica di ottenere il massimo grado di sicurezza nell'utilizzo di farmaci e fitoterapici, la prassi più logica è somministrare il dosaggio minimo necessario a ottenere l'effetto terapeutico. Massimizzare la biodisponibilità è quindi fondamentale al fine di ridurre il più possibile il dosaggio di un farmaco. Ottenere il massimo grado di sicurezza possibile è importante anche quando si parla di sostanze "naturali": tutti quei fitoderivati che essendo quasi sempre commerciabili in regime di libera vendita, sono purtroppo soggetti all'utilizzo sconsiderato in virtù della loro derivazione naturale che appare, a volte erroneamente, come genuina, innocua ai più.

Il resveratrolo mostra una biodisponibilità molto bassa, come tanti altri polifenoli e molte sostanze di origine naturale: per aumentare la sua disponibilità e quindi massimizzarne i benefici e la sicurezza sono stati proposti moltissimi metodi, che si analizzeranno in questo capitolo. Metodiche galeniche più semplici sono impiegate per quanto riguarda la produzione di integratori alimentari, metodiche più tecnologicamente raffinate invece sono più spesso impiegate nella ricerca in prospettiva di confermare le potenzialità terapeutiche del resveratrolo.

4.0.1. - Fattori che influenzano la biodisponibilità della via orale

Quando uno xenobiotico viene somministrato per via orale deve superare una serie di sbarramenti prima di raggiungere il circolo sanguigno:

1. **l'ambiente acido gastrico:** il pH dello stomaco è estremamente basso e può interagire chimicamente con la sostanza, degradandola. Le sostanze pure sono più soggette a questo rischio, se invece consideriamo un principio attivo inserito in una matrice più o meno complessa il rischio di degradazione acida diminuisce, fino ad azzerarsi nel caso di forme farmaceutiche gastroprotette;
2. **gli enterociti e il microbiota intestinale:** i primi, interconnessi da giunzioni strette, formano una barriera superabile solo da sostanze che presentano determinate caratteristiche chimiche.

Inoltre gli enterociti sono dotati anche di citocromi e pompe di estrusione. Il microbiota a sua volta presenta capacità metabolica propria;

3. **il fegato** e la sua azione detossificante, grazie alle reazioni di funzionalizzazione e di coniugazione.

Aumentare l'assorbimento di una sostanza scarsamente assorbita significa quindi renderla capace di superare uno o più di questi ostacoli. Un maggiore assorbimento quindi permetterà di ritrovare nel torrente circolatorio una concentrazione maggiore dello xenobiotico immodificato e aumentarne quindi la biodisponibilità.

4.1 - Enhancer di origine vegetale

La preparazione *Trikatu* si riferisce a una combinazione di 3 “farmaci”: *Maricha*, *Pippali* e *Shunthi*, rispettivamente *Piper nigrum* L., *P. longum* L. e *Zingiber officinalis* R., ricchi di piperina. L'idea di utilizzare sostanze come bioincrementatori della biodisponibilità di altre appartiene da millenni alla medicina ayurvedica: la preparazione *Trikatu* viene utilizzata sin dal settimo secolo a.C. ma solo nel 1979 ha ottenuta una validazione scientifica: quando gli scienziati indiani del Indian Institute of Integrative Medicine riconobbero alla piperina la proprietà di bioincrementatore, coniando anche il termine *bioavailability enhancer*.

Gli incrementatori erbali della biodisponibilità sono agenti di origine vegetale in grado di aumentare la biodisponibilità e la bioefficacia di un farmaco o di un nutriente col quale è co-somministrato, senza manifestare una propria attività farmacologica alla dose impiegata.

Più frequentemente sono abbinati ad altre sostanze sempre di origine vegetale, proprio perché sono queste ultime ad avere i profili di assorbimento più limitati e una modifica del loro assorbimento di pochi punti percentuali può avere risvolti sull'effetto terapeutico molto più ampi. Dal punto di vista teorico i bioenhancer erbali possono considerarsi come degli eccipienti inerti per quanto riguarda l'effetto terapeutico del fitoterapico a cui vengono abbinati, ma non inerti in senso assoluto, in quanto hanno un loro specifico meccanismo d'azione che spesso coinvolge gli enzimi citocromiali (soprattutto quelli di fase 2) e i trasportatori transmembrana come quelli di efflusso (un esempio tra tutti: la glicoproteina-P).

Alcuni esempi di enhancer di origine erbale e i loro meccanismi d'azione vengono elencati in seguito.

1. **Piperina** (in FIGURA 17): alcaloide presente nelle piante del genere *Piper* come *P. nigrum* e *P. longum*, in quantità dal 5 al 9%. Si ritiene che sia capace di inibire gli enzimi che catalizzano le reazioni metaboliche di fase 2.

2. **Naringenina**¹⁴: inibitore del CYP3A4 a livello intestinale e inibitore di P-gp (in FIGURA 20). Si trova nei semi di pompelmo anche se altre scuole di pensiero imputano questa attività alle furocumarine e in particolare alla bergamottina¹⁵.
3. **Acido gallico**: inibizione di CYP3A4
4. **Sinomenina**: alcaloide estratto dalla radice di *Sinomenium acutum* T.¹⁶, agisce da P-gp inibitore.
5. **Genisteina** (in FIGURA 18): isoflavone anch'esso inibitore di P-gp, presente nei fitocomplessi di piante come la soia (*Glycine max* L.) e il kuzu (amido che si ricava da *Pueraria lobata* W. o *Pueraria irsuta* T.)
6. **Cumino dei prati** (*Carum carvi* L.), anche chiamato "anice dei Vosgi": contiene il carvone, terpenoide estratto dai semi e inibitore di P-gp.
7. **Zenzero**: dalla pianta di *Zingiber officinalis*, il cui fitocomplesso contiene i gingeroli (sesquiterpeni) che interagiscono con l'epitelio del tratto gastrointestinale e facilitano l'assorbimento
8. **Estratto di Aloe vera L.**: probabilmente il meccanismo di enhancer è dovuto ai polisaccaridi che agiscono come stimolanti della penetrazione attraverso l'interazione con le giunzioni strette degli enterociti.
9. **Liquirizia** (in FIGURA 19): la radice di *Glycyrrhiza glabra* L. contiene la glicirrizina, una saponina triterpenica con proprietà tensioattive.

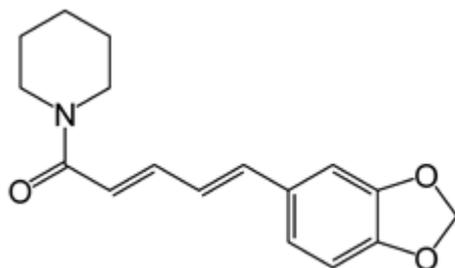


FIGURA 17. Piperina.

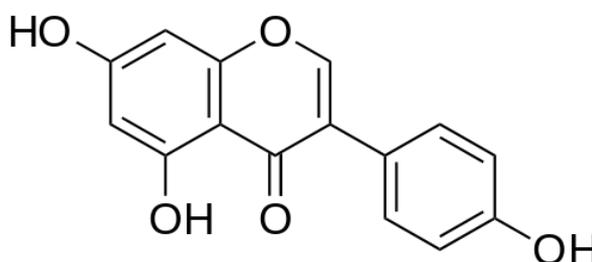


FIGURA 18. Genisteina.

¹⁴ glicoside flavanolic caratteristico dei frutti del genere *Citrus*, nei quali contribuisce al sapore amaro

¹⁵ appunti di lezione

¹⁶ pianta della famiglia Menispermaceae originaria delle foreste dell'Asia subtropicale e temperata e utilizzata nella medicina tradizionale cinese

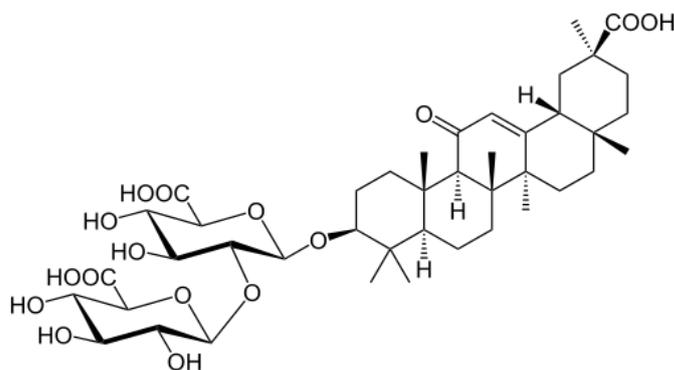


FIGURA 19. Glicirrizina.

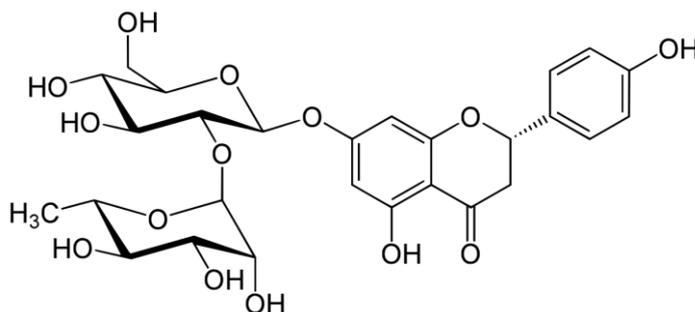


FIGURA 20. Naringenina.

Alla luce di queste conoscenze l'utilizzo della piperina come enhancer è stato testato per migliorare la biodisponibilità del resveratrolo.

In uno studio di Johnson *et al.* (2011) condotto sul modello murino e utilizzando la tecnologia LC/MS i ricercatori hanno determinato l'effetto della co-somministrazione di piperina e resveratrolo sui livelli sierici di resveratrolo e del suo metabolita resveratrolo-3-*O*-glucuronide. Ai topi C57BL sono stati somministrati tramite sonda gastrica:

- 100 mg/kg di solo resveratrolo
- 100 mg/kg di resveratrolo + 10 mg/kg di piperina.

I livelli sierici analizzati dopo vari intervalli di tempo hanno mostrato che il grado di esposizione, espresso per mezzo dell'AUC, era aumentato del 229% e che la C_{max} (concentrazione plasmatica massima) era aumentata del 1544% nei topi a cui era stata somministrata l'associazione. I risultati sono mostrati nelle **FIGURE 21A e 21B**.

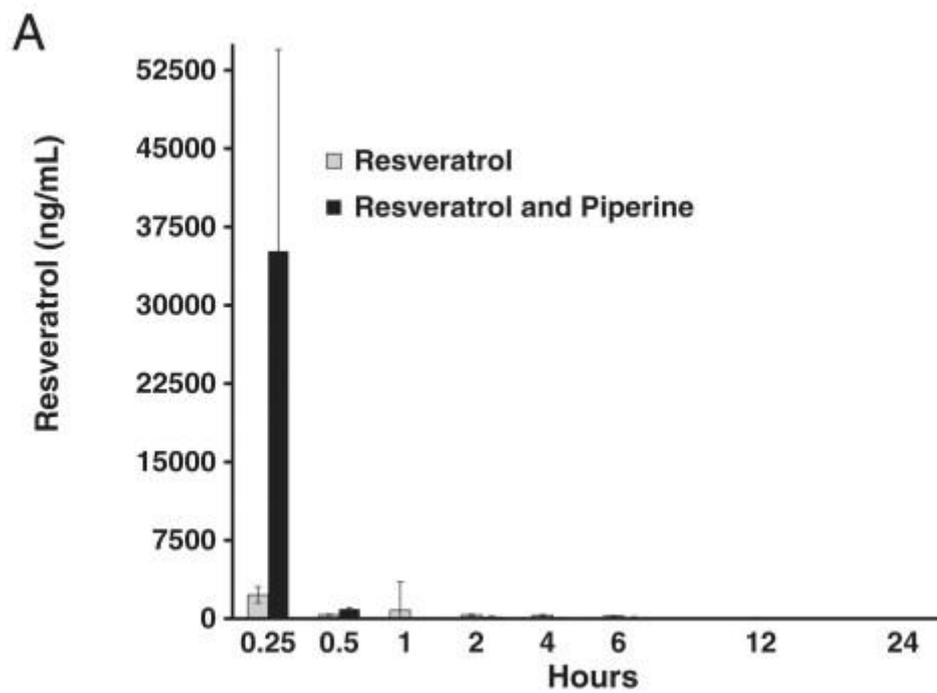


FIGURA 21A. Grafico concentrazione plasmatica/tempo per il resveratrolo (Johnson *et al.*, 2011).

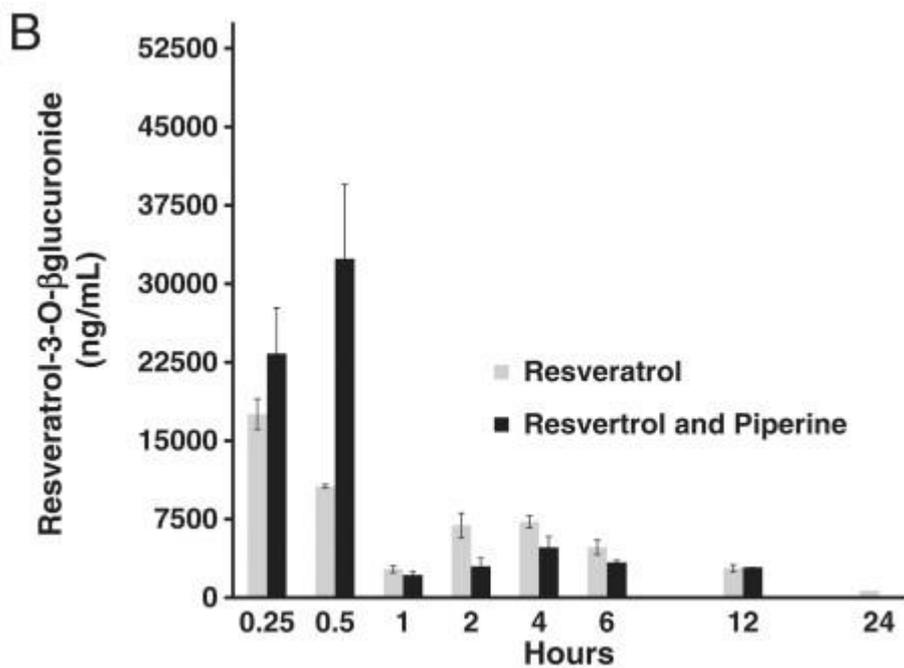


FIGURA 21B. Concentrazione plasmatica/tempo per il metabolita resveratrolo-3-O-glucoronide (Johnson *et al.*, 2011).

4.2 - Fitosomi

I fitosomi sono un innovativo sistema di rilascio utile per migliorare il profilo farmacocinetico degli attivi di origine vegetale scarsamente biodisponibili senza ricorrere all'aggiunta di coadiuvanti farmacologici o a modificazioni strutturali degli ingredienti.

L'intuizione delle possibilità di applicazione della tecnologia del fitosoma per aumentare la biodisponibilità dei composti vegetali viene dall'osservazione della stretta affinità che intercorre tra molti polifenoli e i fosfolipidi nei tessuti vegetali da cui vengono estratti.

Il fitosoma quindi si compone di una parte fosfolipidica che funge da vettore anfifilico e di un fitoderivato purificato come principio attivo, legati tra loro da legami deboli come le forze di Van Der Waals. Il fitosoma è il risultato di una reazione stechiometrica che avviene tra il fosfolipide (spesso fosfatidilcolina) e il fitocomponente di interesse, standardizzato e purificato, in solventi non polari. Il rapporto stechiometrico fosfolipide/fitoterapico è spesso 1:1 o 2:1. Il fitosoma quindi è un'entità chimica di per se stesso.

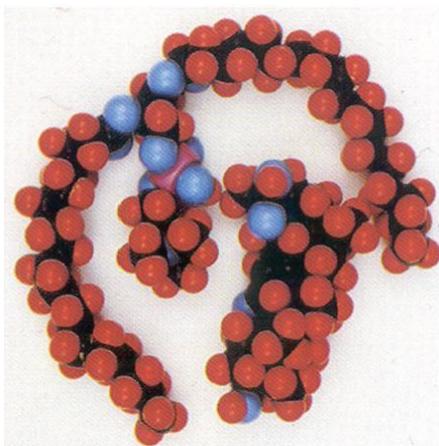


FIGURA 22. Interazione fra testa polare del fosfolipide e il principio attivo, con le due catene alifatiche ripiegate attorno alla testa. Da: slides di lezione.

L'involucro lipofilo (mostrato in **FIGURA 22**) fornisce una schermatura al fitoderivato che gli permette di resistere all'ambiente acido dello stomaco ma anche all'attacco degli enzimi intestinali.

Altre caratteristiche del fitosoma sono:

- punto di fusione ben definito
- capacità di solubilizzarsi in solventi debolmente polari e aprotici
- stabilità a temperature fino a 70°C e oltre le 2 ore;
- stabilità in ambiente acquoso, dove formano delle micelle.

I fitosomi sono un sistema di veicolazione inizialmente pensato per l'applicazione topica: infatti la membrana fosfolipidica, di cui il fitosoma è costituito, in ambiente acquoso forma una vescicola

capace di fondersi con le membrane cellulari (a loro volta costituite da fosfolipidi), il meccanismo è riportato in FIGURA 23.

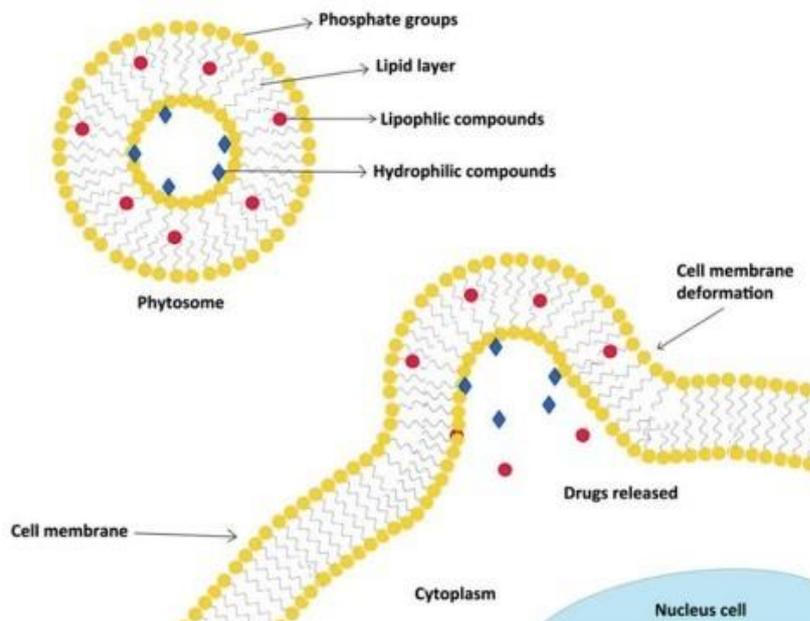


FIGURA 23. Meccanismo di rilascio del fitosoma (Susilawati *et al.*, 2021).

I fitosomi non vanno confusi con i liposomi: nei primi il “principio attivo” da veicolare è complessato alla testa del vettore fosfolipidico con legami chimici, nel secondo il principio attivo è dissolto nella cavità centrale o in mezzo ai due foglietti che compongono la membrana. Inoltre nei liposomi non c’è nessuna correlazione stechiometrica (FIGURA 24).

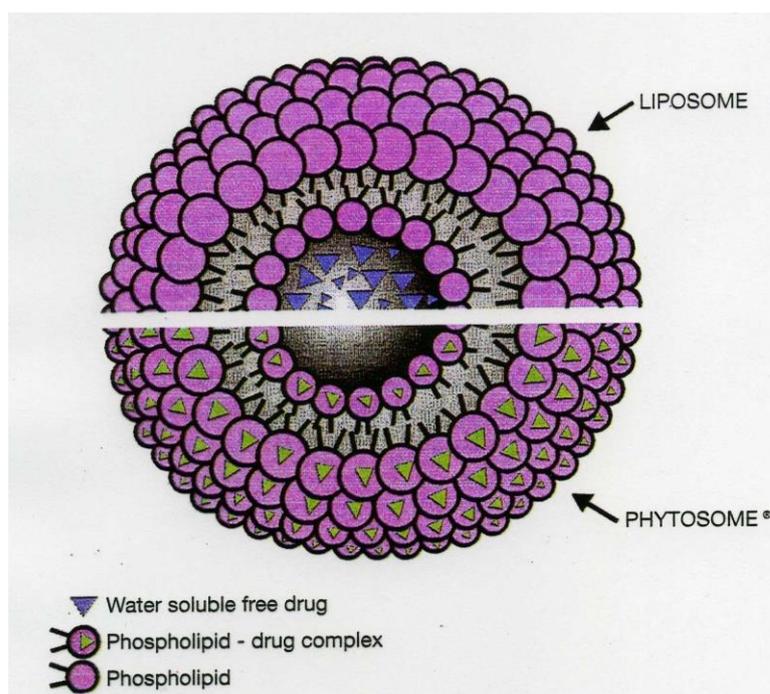


FIGURA 24. Differenze tra fitosoma e liposoma. Da: slides di lezione

I miglioramenti nella farmacocinetica delle sostanze veicolate in forma fitosomiale, per quanto riporta la letteratura, si attestano almeno al triplo per la disponibilità all'assorbimento rispetto alla forma molecolare nuda, fino ad arrivare anche a risultati 30 volte superiori. Nel caso di polifenoli poco solubili come il resveratrolo, il fitosoma è un espediente di veicolazione molto interessante: il resveratrolo acquisisce la versatilità chimica del fosfolipide e, di conseguenza, la sua biodisponibilità aumenta notevolmente.

Kalita *et al.* (2015) hanno formulato una forma fitosomiale del resveratrolo e ne hanno testato l'attività antiinfiammatoria per uso transdermico. Il fosfolipide utilizzato è la fosfatidilcolina: il fitosoma così ottenuto ha una forma rotonda e regolare (FIGURA 25), con un diametro di 1 μm , e mostra una migliore solubilità in acqua rispetto al resveratrolo puro e un coefficiente di ripartizione compatibile con la somministrazione percutanea. Gli studi in vivo mostrano, per la forma fitosomiale, un aumento dell'assorbimento rispetto al resveratrolo puro (FIGURA 26).

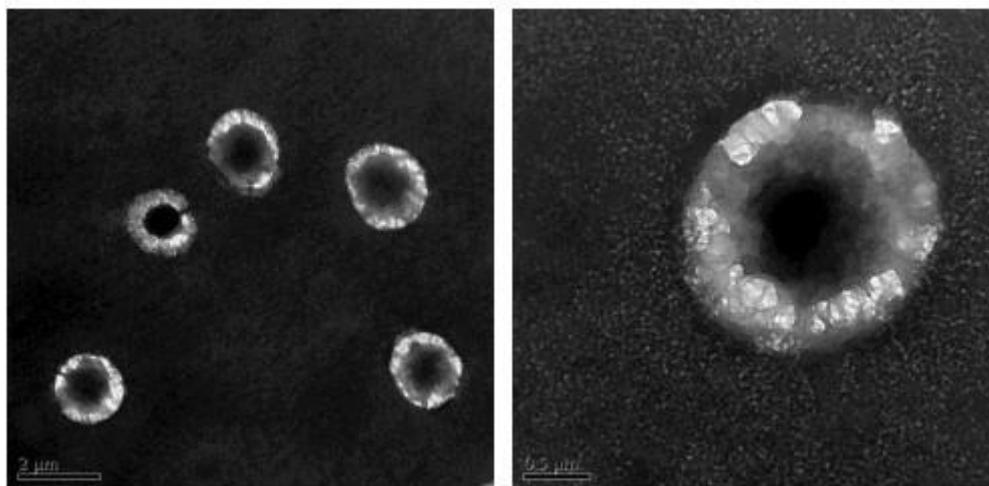


FIGURA 25. Fitosoma fosfatidilcolina-resveratrolo al microscopio elettronico a trasmissione. Da: Kalita *et al.* (2015).

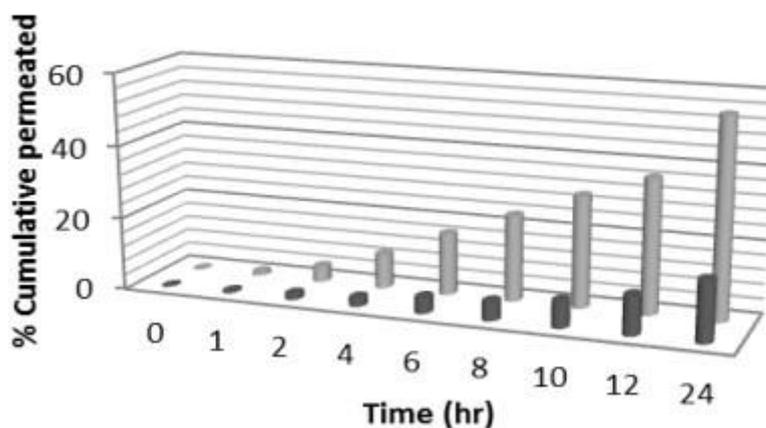


FIGURA 26. Confronto tra la permeazione cutanea del resveratrolo puro (colonne scure) e il resveratrolo fitosomiale (colonne chiare). Da: Kalita *et al.* (2015).

Se per uso topico si fonde con la membrana cellulare, il fitosoma somministrato per via orale invece viene internalizzato per mezzo dello stesso processo col quale sono assorbiti grassi e trigliceridi alimentari: tramite incorporazione nei chilomicroni.

La forma fitosomiale del resveratrolo ha dimostrato un incremento dell'AUC: così incapsulato il resveratrolo è in grado di sfuggire alla glucuronidazione da parte degli enzimi presenti in sede intestinale di cui sarebbe substrato.

I limiti dell'utilizzo dei fitosomi per quanto riguarda i fitoterapici sono principalmente la difficile lavorazione della materia prima e i costi più alti, soprattutto quando si lavora su piccola scala. Ciononostante la tecnologia del fitosoma rappresenta una risorsa notevole nella sfida per l'incremento della biodisponibilità dei fitoterapici e, visti le numerose prove della sua validità presenti in letteratura, l'aspettativa è quella di un utilizzo sempre più diffuso.

4.3 - Sinergie tra combinazioni di fitoterapici

I polifenoli in particolare, nonostante la maggior parte di essi sia poco biodisponibile quando somministrati da soli, hanno dimostrato in vari studi di poter creare sinergie se somministrati in combinazione tra di loro o con altri fitoterapici ma anche con farmaci antitumorali.

Arora *et al.* (2019) riportano alcuni esempi di utilizzo sinergico del resveratrolo.

1. Studio su cellule tumorali della prostata, condotto *in vivo* e *in vitro*, con resveratrolo e quercetina (FIGURA 27). La biodisponibilità del resveratrolo è incrementata e diminuisce la quota di stilbenoide che incorre in solfatazione, aumentando di conseguenza l'effetto antiproliferativo sulle cellule tumorali.

2. Uno studio *in vivo* sul cancro alla prostata e trattamento combinato con resveratrolo e curcumina (FIGURA 28): maggiore inibizione della crescita delle cellule tumorali rispetto agli effetti dei due fitoterapici testati singolarmente.

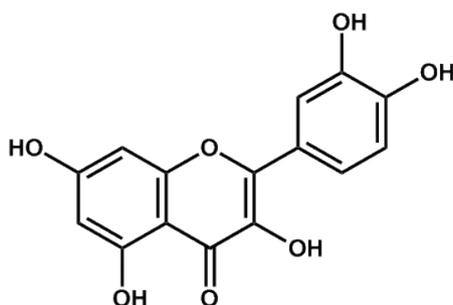


FIGURA 27. Quercetina.

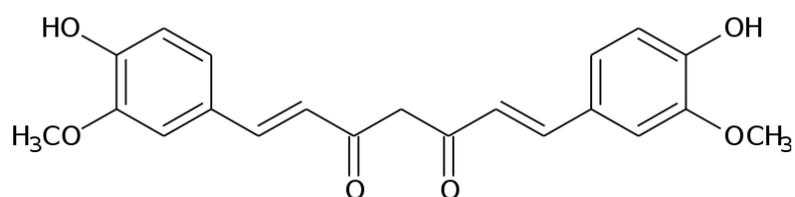


FIGURA 28. Curcumina.

4.4 - Tecniche formulative

Per aumentare la limitata biodisponibilità del resveratrolo, nell'ultimo decennio sono stati sviluppati moltissimi approcci formulativi, anche molto diversi tra loro, che prendono ispirazione dalla tecnologia farmaceutica. Le principali sono riassunte nella FIGURA 29.



FIGURA 29. Principali sistemi di somministrazione del resveratrolo per migliorare la sua biodisponibilità orale.

L'incapsulazione per esempio è una tecnica tipica del farmaco ma che ormai viene utilizzata moltissimo anche nel mondo dei fitoterapici e degli integratori alimentari: risulta infatti estremamente più comoda per la maggior parte dei pazienti l'assunzione di preparati sotto forma di pratiche capsule/comprese e soft-gel, molto meno laboriosa è anche la conservazione delle stesse. Le tecniche di incapsulazione, molte e varie, saranno approfondite in seguito. Il resveratrolo si trova questa forma di veicolazione che incrementa la sua solubilità, stabilizza il preparato contro la possibilità di isomerizzazione *trans/cis* e ne migliora la biodisponibilità.

Anche le dispersioni solide rappresentano un'attraente alternativa per il resveratrolo: la possibilità di sfruttare le proprietà degli eccipienti infatti permette di aumentare la solubilità e la capacità di dissoluzione dello stilbenoide, ma anche il suo assorbimento *in vivo*.

La riduzione della dimensione delle particelle con l'ottenimento di micro e nanoparticelle è un'altra metodica galenica molto utilizzata. Micronizzazione e nanonizzazione si possono realizzare anche con la tecnica del *co-grinding* ovvero la co-macinazione di eccipienti funzionali. La produzione di nanoparticelle e nanocristalli rappresenta una strategia molto promettente che migliora la solubilità, la velocità di dissoluzione, la stabilità fisica e chimica e la compatibilità di dosaggio e biodisponibilità orali di sostanze come il resveratrolo.

Di seguito sono riportate le principali tecniche impiegate per incrementare la biodisponibilità orale del resveratrolo per mezzo di alcune formulazioni prese come esempi.

4.4.1 - Niosomi

I niosomi sono una tipologia di vescicole che consistono in un core acquoso racchiuso da un doppio strato di tensioattivi non-ionici. Strutturalmente sono simili ai liposomi e presentano proprietà fisiche simili ma i niosomi vantano una maggiore stabilità chimica e sono più economici da produrre.

Vankayala *et al.* (2018) hanno preparato niosomi con resveratrolo biocompatibile mediante il metodo di sonificazione¹⁷ utilizzando tensioattivi non ionici e un alcol grasso come stabilizzante. La formulazione è stata preparata con Span®60¹⁸ e alcol cetilico in un rapporto molare di 1:0,5. I niosomi ottenuti erano di forma sferica e presentavano una superficie liscia, caratterizzati da una dimensione delle particelle di 108 ± 3 nm con un PDI¹⁹ di $0,24 \pm 0,01$ e un ζ -potenziale di $52,8 \pm 0,6$ mV. L'efficienza di incapsulamento del resveratrolo in questo sistema era dell' $81 \pm 2\%$, e l'effettivo incapsulamento è stato confermato mediante spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)²⁰ e da misure di calorimetria differenziale a scansione (DSC). La quantità di resveratrolo incapsulato da questo sistema è tale da risultare promettente per ulteriori applicazioni.

È noto che i sistemi di somministrazione come i niosomi possono ridurre il rilascio a causa di molteplici fattori: ad esempio con il resveratrolo ciò potrebbe essere dovuto alla lipofilia del principio attivo intrappolato nel niosoma. Dagli studi *in vitro* si nota infatti che il rilascio, simulando l'ambiente gastrointestinale, si attesta intorno al 30% per la forma libera e al 9% per la forma niosomiale (Span

¹⁷ Si veda più avanti, sezione 4.4.8.

¹⁸ Sorbitano monostearato, emulsionante lipofilo standardizzato per preparazioni farmaceutiche.

¹⁹ Indice di polidispersità.

²⁰ È un metodo per determinare la struttura delle molecole che raccolgono uno spettro vibrazionale molecolare.

60 e alcol cetilico) entro 2 ore a pH 1,2. Successivamente, a pH 7,4, circa il 96% del resveratrolo è stato rilasciato dalla sua forma libera entro 7 ore, mentre quello incapsulato è stato rilasciato per circa l'81% dopo 12 ore (FIGURA 30).

Come spiegato nel capitolo precedente, gli studi suggeriscono che una somministrazione continuativa e moderata di resveratrolo sia migliore della somministrazione di una singola dose più alta. Questa particolare formulazione invece ha mostrato una tossicità molto bassa o trascurabile nei confronti delle cellule macrofagiche RAW264.

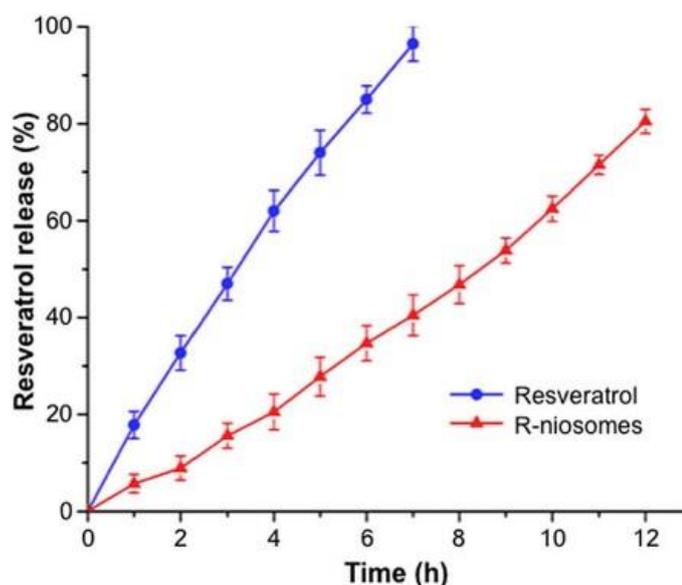


FIGURA 30. Profilo di rilascio *in vitro* del resveratrolo libero e del resveratrolo incapsulato in niosomi. Le prime 2 ore di dialisi sono state condotte in una soluzione mantenuta a pH 1,2 utilizzando HCl 0,1 N e sono continuate in una soluzione tampone fosfato a pH 7,4 per 10 ore, al fine di simulare rispettivamente le condizioni gastriche e intestinali (Machado *et al.*, 2019).

Ogni tecnica va valutata in funzione dell'effetto che si vuole ottenere e ogni modifica alla farmacocinetica può influenzare la dinamica del resveratrolo, così come avviene per ogni principio attivo. La scelta della tecnica migliorativa della biodisponibilità quindi deve tenere conto di tutti questi aspetti e essere validata da appropriati studi di farmacocinetica.

4.4.2 - Nanocarriers lipidici e liposomi

Per migliorare l'assorbimento intestinale del resveratrolo, sostanza idrofobica, sono state sviluppate diverse formulazioni basate su lipidi.

I liposomi sono i pionieri tra i sistemi vescicolari di trasporto dei principi attivi: sono vescicole formate da fosfolipidi ma possono includere anche colesterolo e altri componenti che concorrono alla stabilità del doppio strato.

Nella FIGURA 31 sono illustrati alcuni esempi di nanocarrier lipidici.

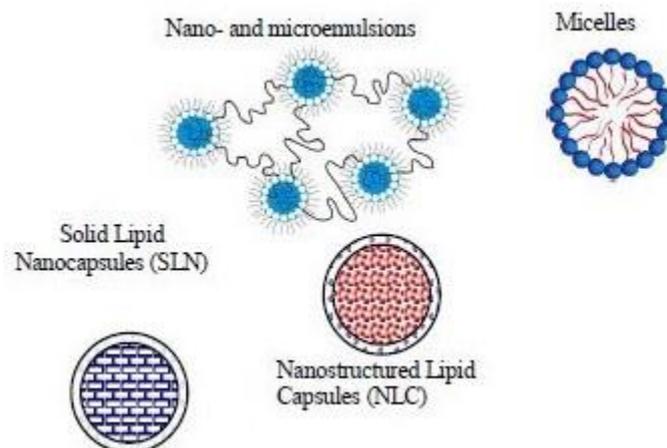


FIGURA 31. Esempi di tecnologie che sfruttano nanocarriers lipidici.

L'uso di nanocarrier lipidici o di liposomi per incapsulare specifici composti rappresenta un'efficace strategia per aumentare la loro solubilità in acqua e stabilità chimica.

Le nanoparticelle lipidiche si sono rivelate efficaci nel veicolare il resveratrolo, migliorando così la sua biodisponibilità orale e il suo potenziale terapeutico. Le nanoparticelle lipidiche solide (SLN) e i trasportatori lipidici nanostrutturati (NLC) si sono dimostrati metodi efficaci per proteggere il resveratrolo dal rapido metabolismo, migliorarne la stabilità fisica e consentirne un rilascio controllato dopo l'assorbimento intestinale. In questo sistema di incapsulamento lipidico, è la presenza stessa del lipide a favorire l'assorbimento di composti lipofili come il resveratrolo.

Un esempio è il lavoro di Basavaraj e Betageri (2014), che hanno incapsulato il resveratrolo in liposomi a base di fosfatidilcolina, aumentando così l'assorbimento orale del composto non modificato.

Recentemente, Zu *et al.* (2018) hanno formulato versioni biocompatibili e biodegradabili del *trans*-resveratrolo, incapsulate in nanocarrier lipidici (RSV-nano) o liposomi (RSV-lipo), come mostrato in (FIGURA 32) e ne valutato le proprietà citotossiche e la capacità di rilascio del resveratrolo all'interno delle cellule 3T3-L1²¹.

²¹ Derivate da tessuti di topo (3T3) e isolate dalla linea cellulare di fibroblasti 3T3. Sono spesso impiegate come modello per comprendere meglio l'accumulo di grasso, l'obesità, la regolazione metabolica e le malattie legate all'accumulo e alla funzione delle cellule adipose.

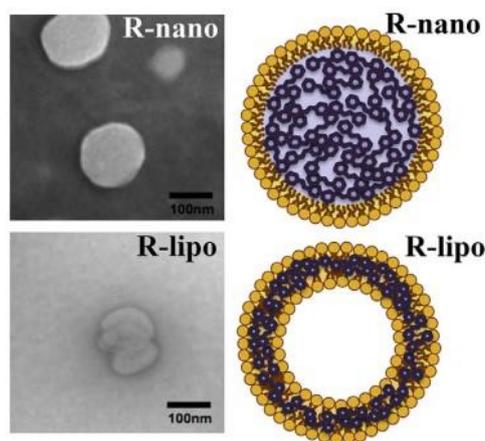


FIGURA 32. Immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) ed esemplificazione delle strutture previste da Zu *et al.* (2018).

I risultati hanno confermato che il RSV-lipo ha una maggiore stabilità fisica e chimica rispetto al RSV-nano, sebbene quest'ultimo mostri un rilascio più prolungato. Entrambi hanno incrementato la quantità di resveratrolo nelle cellule 3T3-L1, ma il RSV-lipo ha dimostrato una maggiore efficacia biologica grazie alla sua migliore stabilità a temperatura ambiente. In generale, questa ricerca ha evidenziato come l'uso di sistemi di incapsulamento lipidico possa essere una valida strategia per migliorare alcuni parametri farmacocinetici del resveratrolo, minimizzando gli effetti collaterali.

4.4.3 - Nanoemulsioni

Le emulsioni sono sistemi dispersi grossolani, formati da due fasi liquide non miscibili, una delle quali (detta fase dispersa, o interna, o discontinua) è dispersa in forma di minute goccioline nell'altra (detta fase disperdente, o esterna, o continua).

Si possono classificare le emulsioni in base alla dimensione delle particelle: le emulsioni propriamente dette presentano particelle con raggio superiore a 100 nm, se il raggio delle particelle è invece inferiore a 100 nm si definiscono si nanoemulsioni. Le emulsioni olio in acqua (O/A) sono formate da particelle lipidiche sferiche disperse in un mezzo acquoso. Queste particelle hanno una struttura core-shell dove il nucleo è formato da molecole di olio e dalle catene idrofobiche dei tensioattivi (cioè agenti emulsionanti). Lo strato polare, invece, è formato dalle teste polari dei tensioattivi. Esistono anche le emulsioni multiple: sistemi organizzati per esempio di acqua in olio in acqua (A/O/A) sono piccole gocce d'acqua intrappolate all'interno di goccioline d'olio più grandi disperse in un mezzo acquoso. In questi sistemi, viene solitamente utilizzato un emulsionante solubile in olio per stabilizzare le goccioline d'acqua interne, mentre un emulsionante solubile in acqua viene utilizzato per stabilizzare le goccioline esterne. Nella **FIGURA 33** sono rappresentate graficamente le tipologie di emulsioni nelle due nature di fase continua: acquosa, in azzurro e oleosa, in giallo.

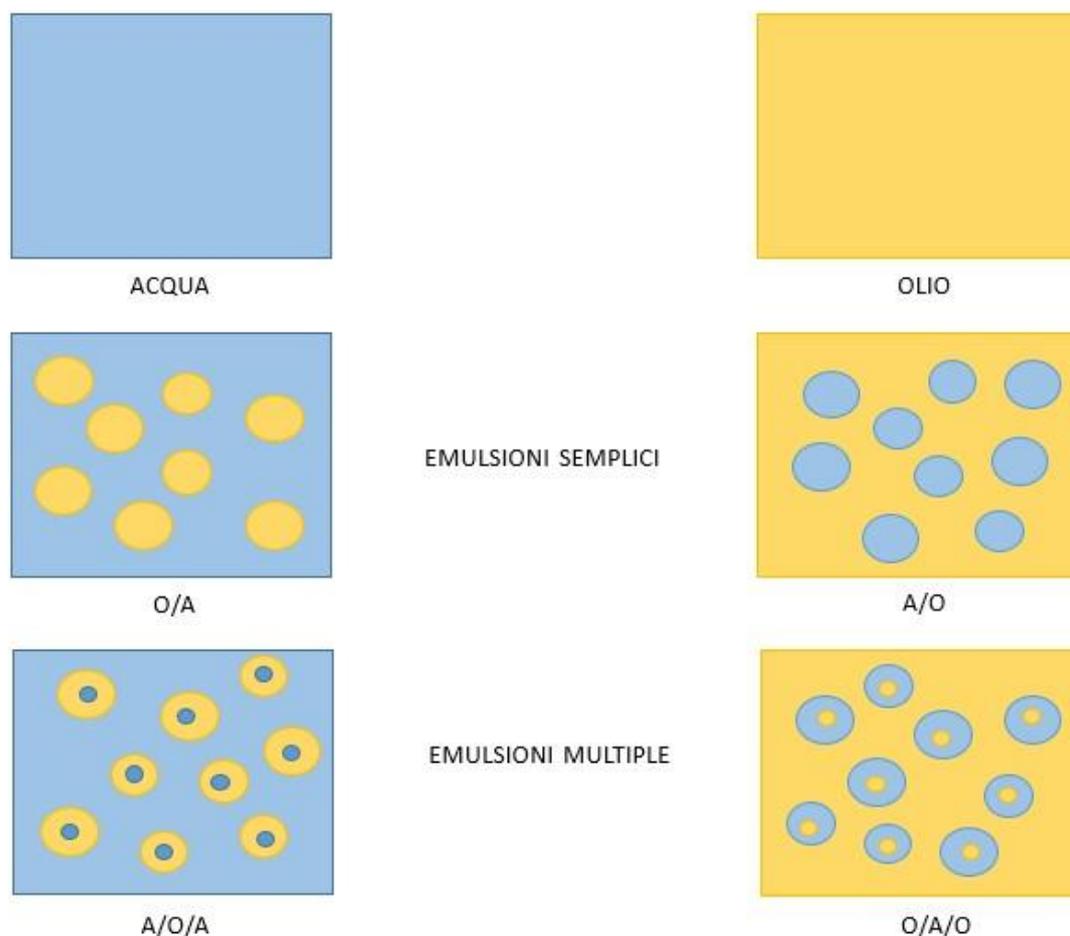


FIGURA 33. Tipologie di emulsioni.

Sessa *et al.* (2011) hanno dimostrato che le nanoemulsioni di dimensioni subcellulari²² hanno la capacità di preservare il resveratrolo dall'alterazione chimica, impedendo reazioni di ossidazione che potrebbero convertirlo nella sua forma *cis*.

In un ulteriore studio, Sessa *et al.* (2014) hanno utilizzato monostrati di cellule Caco-2, modelli di epitelio intestinale umano, per dimostrare che le nanoemulsioni contenenti resveratrolo non presentano alcun tipo di tossicità. Inoltre, queste formulazioni, in particolare quelle a base di lecitina, consentono il rilascio graduale del resveratrolo attraverso l'epitelio intestinale, proteggendolo dalla degradazione.

I *Self-nanoemulsifying drug delivery systems* (SNEDDS), ovvero i sistemi di rilascio di farmaci auto-nanoemulsificanti si sono rivelati particolarmente efficaci nella veicolazione di composti lipofili. Gli studi condotti hanno dimostrato che gli SNEDDS contenenti resveratrolo non solo migliorano la sua biodisponibilità orale, ma possono anche avere effetti anti-fatica nel ratto, secondo Yen *et al.* (2017). Gli studi di farmacocinetica hanno rivelato un aumento significativo della

²² Ottenute mediante omogeneizzazione ad alta pressione (HPH).

biodisponibilità orale del resveratrolo veicolato come SNEDDS, pari a 3,2 volte rispetto alla soluzione di resveratrolo immodificato. La formulazione di Yen e collaboratori, in FIGURA 34, in particolare si compone di Capryol™ 90 come fase oleosa e Cremophor® EL e Tween 20 come tensioattivi in rapporto massa/massa di 60:35:5; il diametro delle particelle si attesta a 41 ± 4 nm con indice di polidispersità pari a $0,4\pm 0,1$.

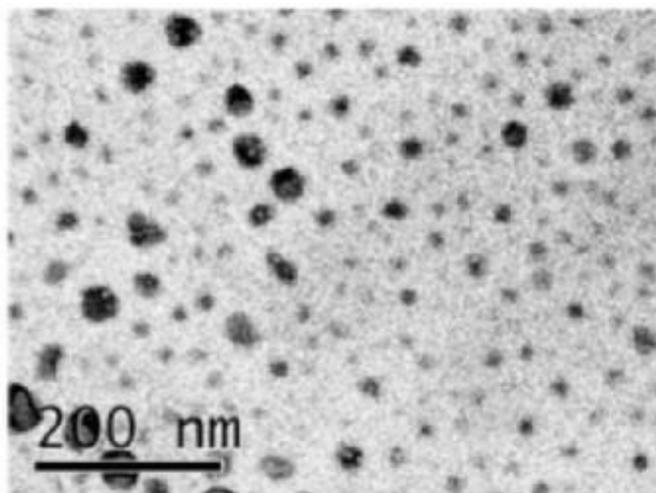


FIGURA 34. Resveratrolo formulato in SNEDDS da Yen e collaboratori, immagine al microscopio TEM (Machado *et al.*, 2019).

Un sistema alternativo per migliorare la biodisponibilità orale del resveratrolo è rappresentato dalle auto-microemulsioni (SME) basate su eccipienti inibitori dell'UDP-glucuronosiltransferasi.

In uno studio di Yang *et al.* (2018), è stata sviluppata una particolare microemulsione di resveratrolo utilizzando eccipienti che inibiscono il metabolismo intestinale. Gli studi di tossicità hanno confermato la sicurezza di questi sistemi SME su linee cellulari Caco-2. Inoltre, sia le SME con inibitori di UGT (SME1) che le SME prive di inibitori (SME2) hanno mostrato un notevole aumento dell'assorbimento del resveratrolo e un rilascio prolungato rispetto al farmaco libero. I dati ottenuti dagli studi su animali, condotti su ratti, hanno evidenziato un significativo incremento anche della biodisponibilità orale del resveratrolo-SME1 rispetto sia al resveratrolo libero che al resveratrolo-SME2, grazie agli eccipienti modulatori dell'UGT. La formulazione di Yang e collaboratori nel dettaglio è composta da: Labrafil, Labrasol e Cremophor RH 40 rispettivamente come fase oleosa, surfattante e co-surfattanti. È stato aggiunto il 4% in peso di resveratrolo per produrre il sistema SME carico; la dimensione media delle particelle è 26 ± 1 nm, il valore di PDI è 0.23 ± 0.01 e il potenziale ζ è di 15 mV. Dallo studio, il rilascio testato *in vitro* del resveratrolo da SME è stato del 27%, mentre dalla sospensione di resveratrolo libero, il rilascio si attesta attorno all'80% entro 45 minuti in acqua a 37°C , come illustrato in FIGURA 35. Inoltre, sono state misurate le biodistribuzioni del resveratrolo nei linfonodi mesenterici dopo somministrazione orale. La formulazione SME di Yang ha significativamente migliorato la distribuzione del resveratrolo nei

linfonodi intestinali rispetto alla molecola imm modificata dopo ogni intervallo temporale testato. I risultati ottenuti dallo studio farmacocinetico *in vivo* hanno mostrato una biodisponibilità assoluta del resveratrolo pari al 76% (nel gruppo con resveratrolo libero si è rivelato appena il 6,5%). Inoltre va notato anche che l'AUC del metabolita resveratrolo-3-*O*-glucoronide è diminuita significativamente del 73% rispetto al gruppo con il principio attivo libero.

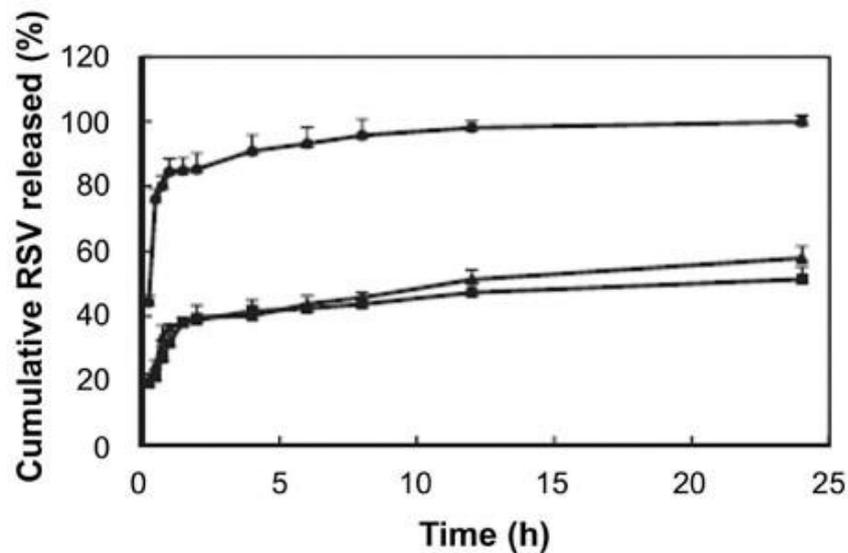


FIGURA 35. Grafico del rilascio percentuale nel tempo del resveratrolo nelle forme: libera (pallino), SME1 (triangolino) e SME2 (quadrato). Da: Machado *et al.* (2019).

4.4.4 - Micelle

Atanackovic *et al.* (2009) hanno verificato che le soluzioni micellari di acidi biliari hanno la capacità di solubilizzare composti organici scarsamente solubili, migliorando così il loro assorbimento: hanno condotto un'indagine sulla capacità di diverse soluzioni micellari di acidi biliari di migliorare la solubilità del resveratrolo e, inoltre, hanno valutato il potenziale emolitico per misurare la tossicità sulla membrana cellulare. I risultati di questo studio hanno evidenziato che tra le soluzioni micellari di acidi biliari testate, quelle contenenti acidi 3,7,12-trichetocolicci hanno mostrato il minor potenziale emolitico e una maggiore capacità di solubilizzare il resveratrolo.

Uno studio di Calvo-Castro *et al.* (2018) ha investigato l'effetto della formulazione micellare sulla biodisponibilità di Vineatrol30, un estratto etanologico standardizzato di germogli di vite, che contiene sia resveratrolo che considerevoli quantità di oligomeri di resveratrolo²³. Lo studio è stato condotto su dodici volontari sani (sei donne, sei uomini) divisi in modo casuale in due gruppi: a un gruppo è stata somministrata una singola dose di 500 mg Vineatrol30 in formulazione in polvere

²³ 30 mg di *trans*-resveratrolo, 75 mg di *trans-ε*-viniferina.

nativa, all'altro Vineatrol30 come soluzione micellare liquida. Il plasma e l'urina sono stati raccolti al basale e nelle 24 ore successive all'assunzione. Il resveratrolo e la viniferina sono stati analizzati tramite HPLC: l'area sotto la curva della concentrazione plasmatica nel tempo (AUC) e le concentrazioni plasmatiche massime medie di *trans*-resveratrolo erano rispettivamente 5,0 volte e 10,6 volte più alte nella formulazione micellare liquida rispetto alla polvere nativa. Tuttavia, non sono state rilevate quantità rilevabili di *trans*- ϵ -viniferina né nel plasma né nell'urina. La permeabilità transepiteliale del *trans*-resveratrolo e della *trans*- ϵ -viniferina attraverso un monostrato di cellule Caco-2 è risultata coerente con le frazioni assorbite *in vivo*. I risultati, riportati nelle FIGURE 36 e 37, mostrano chiaramente che la formulazione micellare liquida ha aumentato significativamente la biodisponibilità orale del resveratrolo contenuto in Vineatrol30 rispetto alla polvere nativa, senza causare effetti collaterali.

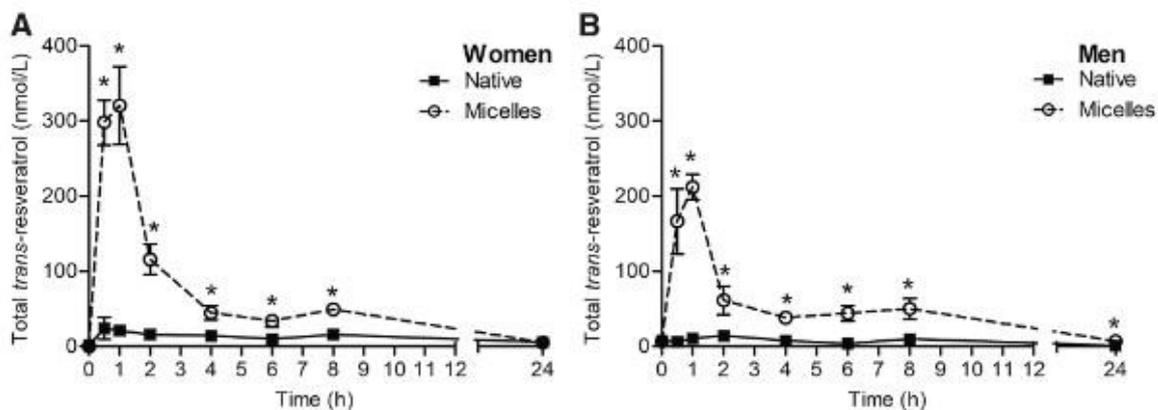


FIGURA 36. Concentrazioni plasmatiche totali medie di *trans*-resveratrolo (nmol/L) dopo l'assunzione di una singola dose di 500 mg di Vineatrol30 come polvere nativa (linea nera) o micelle liquide (linea tratteggiata), in **A.** sei donne sane e **B.** sei uomini sani. Da: Calvo-Castro *et al.* (2018).

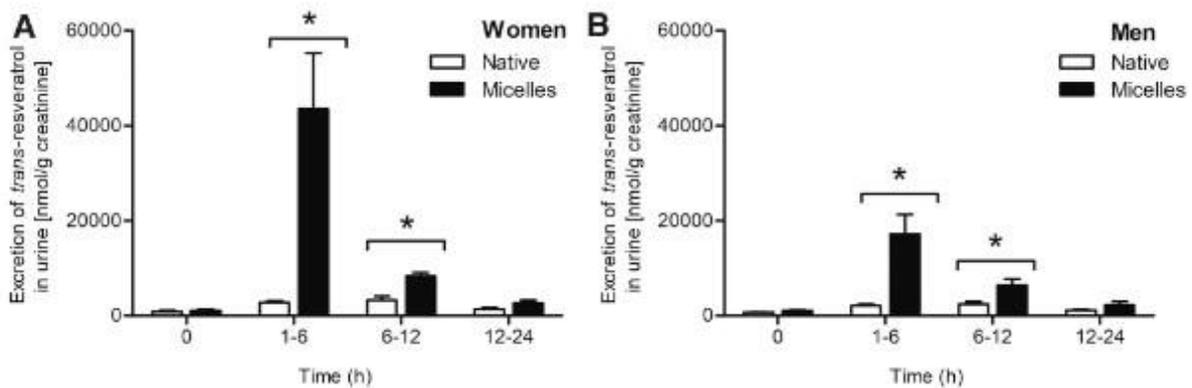


FIGURA 37. Profilo di escrezione urinaria del *trans*-resveratrolo (nmol/g creatinina) nelle 24 ore in **A)** sei donne e **B)** sei uomini dopo una singola dose orale di 500 mg di Vineatrol30 come polvere nativa (colonne bianche) o micelle liquide (colonne nere). Da: Calvo-Castro *et al.* (2018).

Un altro studio, condotto da Peñalva *et al.* (2018), ha rivelato che particelle colloidali altamente idratate, come le micelle di β -caseina, costituiscono efficaci veicoli per la somministrazione orale. Le forme micellari della caseina dimostrano una notevole abilità nell'incapsulare composti idrofobici. In particolare, è stato osservato che quando le nanoparticelle di caseina vengono somministrate per via orale ai ratti e raggiungono la superficie dell'epitelio intestinale, regolano il rilascio del resveratrolo, migliorandone l'assorbimento e la biodisponibilità orale. Si può quindi concludere che il resveratrolo può essere incapsulato con successo nelle nanoparticelle di caseina. Questa modalità di veicolazione presenta interessanti proprietà per la somministrazione orale di questo stilbenoide: in primo luogo, le nanoparticelle di caseina rilasciano il resveratrolo secondo una cinetica del tipo di ordine zero e il tasso di rilascio non è influenzato dalle condizioni di pH; in secondo luogo, le nanoparticelle di caseina promuovono l'assorbimento del resveratrolo mostrandone livelli tangibili nel plasma per almeno 8 ore. La biodisponibilità orale del resveratrolo quando è incapsulato in nanoparticelle di caseina è stata calcolata vicina al 26,5%. Nell'immagine sottostante una microfotografia al SEM delle micelle caseiniche di resveratrolo (FIGURA 38).

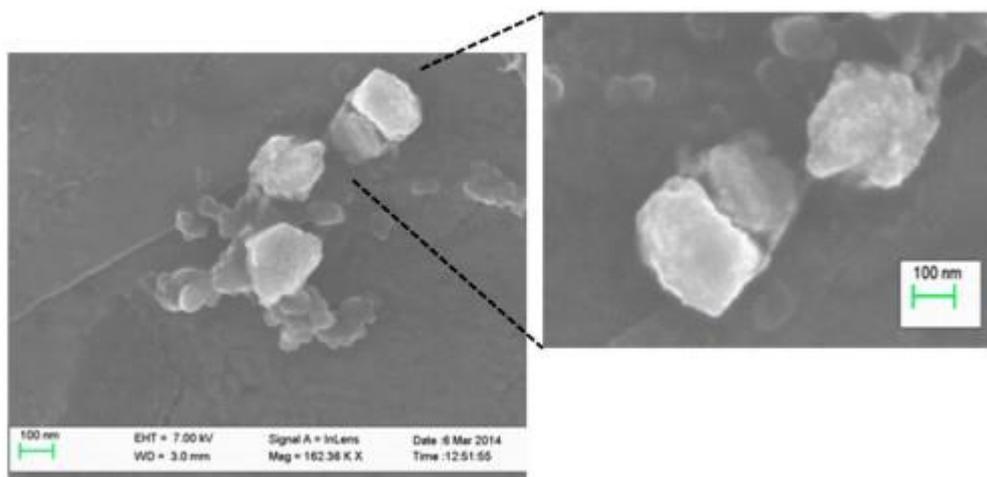


FIGURA 38. Microfotografie ottenute dal microscopio elettronico a scansione di nanoparticelle di caseina caricate di resveratrolo (Peñalva *et al.*, 2018).

4.4.5 - Nanoparticelle polimeriche

Tra le diverse formulazioni basate su nanoparticelle (NPs) preparate per migliorare la somministrazione del resveratrolo, alcune coinvolgono l'incapsulamento in nanoparticelle polimeriche biodegradabili. Alcune strutture di tecnologie di questo tipo sono illustrate in FIGURA 39.

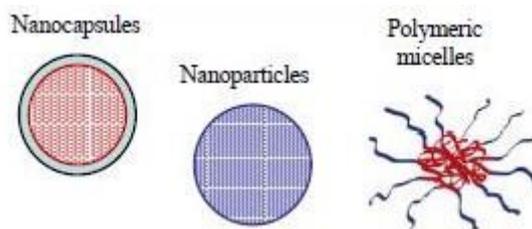


FIGURA 39. Tipologie di nanocarriers su base polimerica.

Il polimero acido poli(lattico-co-glicolico), da qui in poi indicato con PLGA, viene utilizzato come componente idrofobico di queste nanoparticelle polimeriche in una varietà di sistemi di rilascio biomedici, grazie alla sua biodegradabilità e biocompatibilità. È stato dimostrato che le nanoparticelle di resveratrolo in PLGA (RSV-PLGA-NPs) rappresentano un metodo stabile di rilascio del resveratrolo, caratterizzate da dimensioni delle particelle ridotte, elevata efficienza di incapsulamento, rilascio controllato del farmaco, maggiore stabilità chimica, solubilità in acqua e bioattività. Wan *et al.* (2018) hanno preparato queste RSV-PLGA-NPs secondo una tecnica di emulsione olio/acqua. Le RSV-PLGA-NPs hanno una morfologia sferica con una dimensione media di 176,1 nm e una carica di -222,6 mV. Queste nanoparticelle mostrano un'elevata efficienza di incapsulamento del resveratrolo (EE%) pari a 97,25%. Si può ottenere un rilascio controllato del resveratrolo, specialmente alle condizioni acide che simulano il passaggio attraverso il tratto gastrointestinale. Inoltre, queste nanoparticelle sono sufficientemente stabili alla conservazione a 4°C per almeno sei mesi, senza cambiamenti nell'EE%. Inoltre, le RSV-PLGA-NPs si sono dimostrate più efficaci nel ridurre la lipogenesi, promuovere la lipolisi e ridurre la proliferazione epatocellulare rispetto al resveratrolo libero. Questi risultati indicano che le RSV-PLGA-NPs forniscono un eccellente e stabile veicolo di somministrazione del resveratrolo, un'alta efficienza di incapsulamento e un rilascio del farmaco ben controllato e inoltre, la scoperta che l'effetto inibitorio delle RSV-PLGA-NPs sulla proliferazione epatocellulare e sull'accumulo lipidico nelle cellule HepG2²⁴ steatosiche potrebbe fornire un nuovo modo per studiare i meccanismi delle NAFLDs.

²⁴ Linea cellulare derivata da tessuto epatico di un paziente con carcinoma epatocellulare.

Gli effetti biologici delle nanoparticelle polimeriche PLGA contenenti resveratrolo sono stati anche valutati nella linea cellulare di carcinoma prostatico LNCaP da Nassir *et al.* (2018). Lo studio ha dimostrato che le nanoparticelle che incapsulano il resveratrolo hanno esercitato una citotossicità maggiore rispetto al resveratrolo libero, a tutte le concentrazioni testate. Inoltre, le nanoparticelle non hanno mostrato effetti citotossici sui macrofagi murini, suggerendo l'uso potenziale di queste formulazioni di resveratrolo per la chemioprevenzione e la chemioterapia del cancro alla prostata, senza particolari effetti indesiderati sulle cellule normali.

Siu *et al.* (2018) in un altro studio hanno indagato sulla biodisponibilità orale e sull'attività anti-infiammatoria *in vitro* delle nanoparticelle di PLGA galattosate che incapsulano il resveratrolo (da ora in poi indicate come RSV-GNPs) sia nel ratto e che nella linea cellulare di macrofagi RAW 264.7²⁵. Le RSV-GNPs di questo studio hanno una dimensione delle particelle di circa 108,4 nm con un indice di polidispersione di 0,217. Inoltre posseggono un'elevata efficienza di incapsulamento e un rilascio lento del farmaco in acqua. Dopo la somministrazione orale, le RSV-GNPs hanno mostrato una migliorata biodisponibilità orale (fino al 335,7%) rispetto al resveratrolo libero (FIGURE 40 e 41). Allo stesso modo, nelle cellule RAW 264.7, le RSV-GNPs hanno dimostrato una maggiore attività anti-infiammatoria.

Questi risultati confermano che le RSV-GNPs, aumentando l'assorbimento intestinale del resveratrolo e migliorando la sua biodisponibilità, potrebbero rappresentare un valido approccio terapeutico contro le malattie infiammatorie.

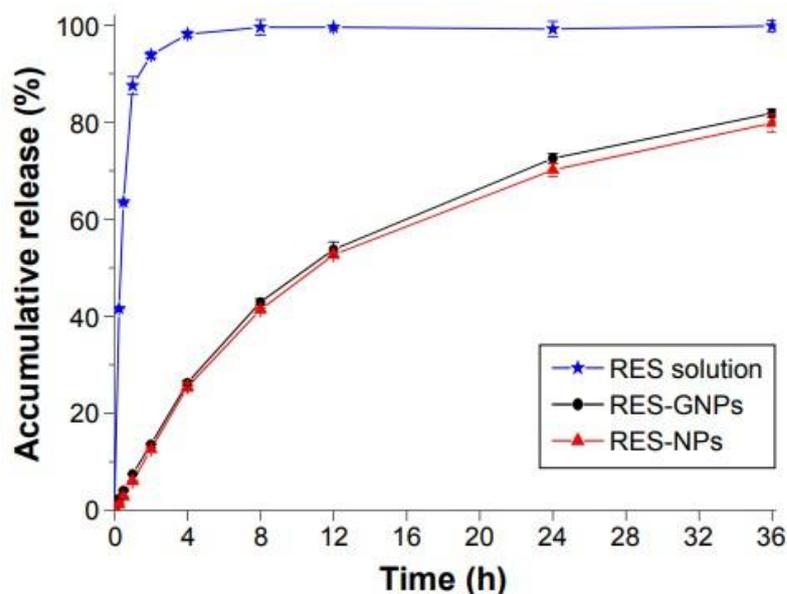


FIGURA 40. Curve di rilascio del RES dalle RES-NPs e dalle RES-GNPs eseguite in acqua utilizzando il metodo del sacco di dialisi. Da: Siu *et al.* (2018).

²⁵ Linea cellulare di macrofagi creata a partire da un tumore in un topo maschio indotto con il virus della leucemia murina di Abelson.

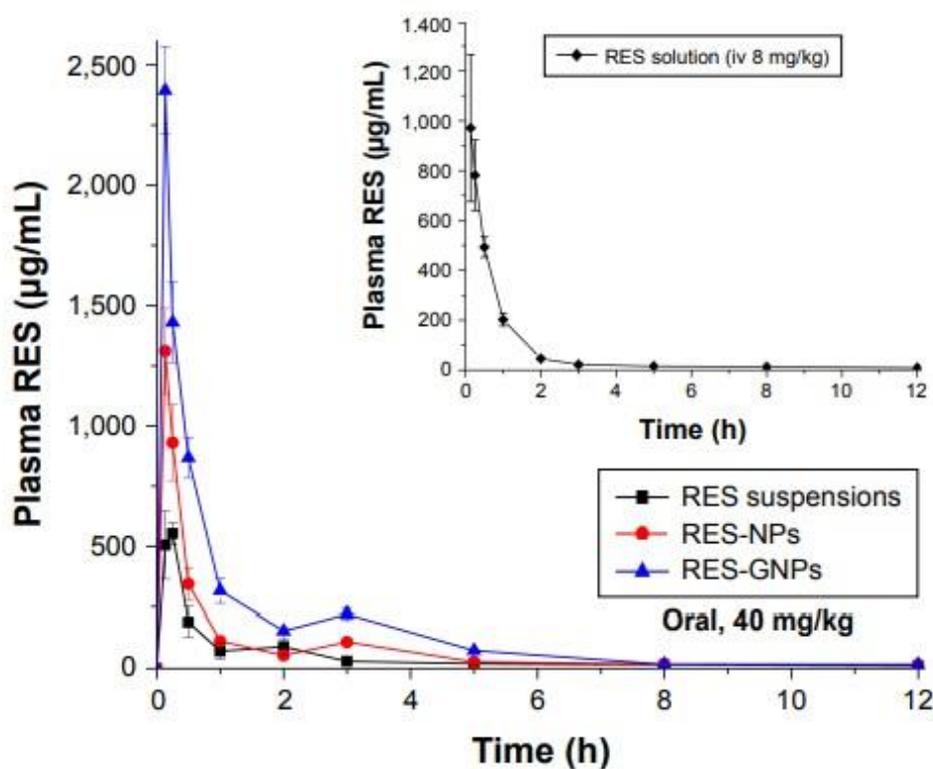


FIGURA 41. Profili farmacocinetici della concentrazione plasmatica di resveratrolo nel tempo dopo somministrazione orale di sospensioni di resveratrolo, nanoparticelle di resveratrolo e RES-GNPs alla dose di 40 mg/kg (n = 5). L'inserto in alto a destra rappresenta la farmacocinetica della soluzione di resveratrolo somministrata per via endovenosa (8 mg/kg). Da: Siu *et al.* (2018).

4.4.6 - Nanoparticelle di silice mesoporosa

Summerlin *et al.* (2016) hanno incapsulato il resveratrolo all'interno di nanosfere di silice mesoporosa²⁶ conosciute come MCM-48 e ne hanno testato l'efficacia in studi sulle attività anti-infiammatoria e antitumorale. Queste nanoparticelle sono state sintetizzate utilizzando il metodo di Stöber²⁷ in presenza di una molecola tensioattiva. Il tetraetossisilicato di etile è stato impiegato come fonte di silice, mentre il copolimero triblocco F127 (Pluronic F127) è stato utilizzato come agente di dispersione delle particelle. Il 20% in peso di resveratrolo è stato aggiunto alle MCM-48 preparate. La caratterizzazione fisico-chimica delle nanoparticelle ha rivelato la presenza di pori cubici disposti in una struttura ordinata, una dimensione media di 283 nm con un PDI di 0,25. L'incapsulamento del resveratrolo è stato confermato attraverso analisi di diffrazione dei raggi X. È emerso che quando il resveratrolo è incapsulato in MCM-48, la solubilità aumenta quasi del doppio. Inoltre, MCM-48-RES ha mostrato una citotossicità dose-dipendente potenziata in confronto al resveratrolo in sospensione

²⁶ Secondo la nomenclatura IUPAC, un materiale mesoporoso è un materiale nanoporoso contenente pori con diametro compreso tra 2 e 50 nm.

²⁷ Processo chimico utilizzato per preparare particelle di silice (SiO₂) di dimensioni controllabili e uniformi per applicazioni nella scienza dei materiali.

acquosa. Il tasso più elevato di apoptosi causato dal resveratrolo-MCM-48 è stato ulteriormente confermato mediante immunoblotting delle proteine apoptotiche. È interessante notare che il RSV-MCM-48 ha mostrato una soppressione significativamente maggiore del NF-κB stimolato da lipopolisaccaridi nei macrofagi rispetto al resveratrolo in sospensione acquosa. Sulla base di questi risultati, si può concludere che le nanoparticelle mesoporose rappresentano un promettente veicolo di somministrazione per il resveratrolo.

I risultati di questo studio, illustrati in **FIGURA 42**, forniscono nuove prospettive sulle nanosfere di silice mesoporosa come mezzo di somministrazione per farmaci idrofobici, contribuendo anche alle prove esistenti sull'utilità del resveratrolo come principio attivo antitumorale.

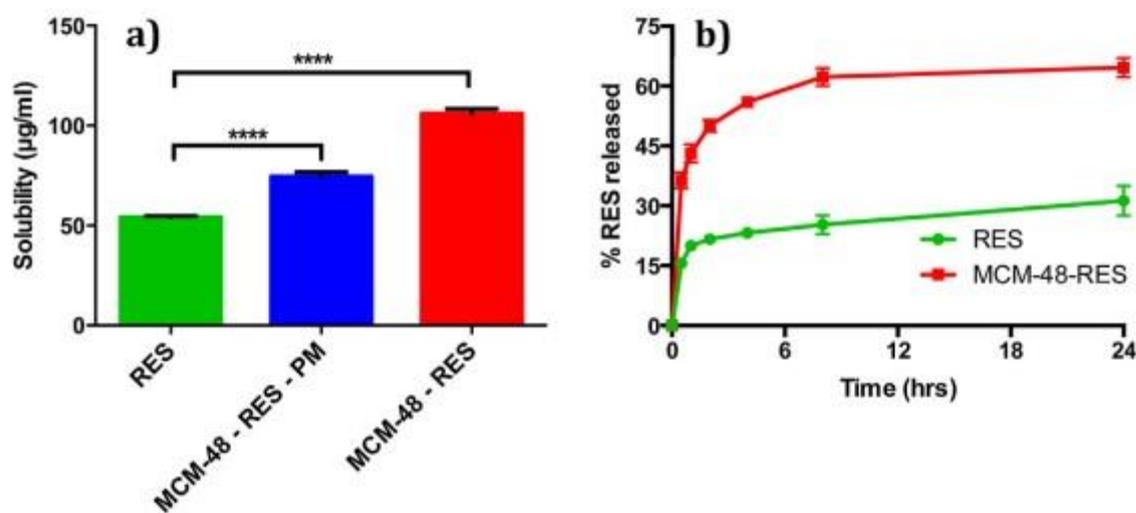


FIGURA 42 A. Solubilità in acqua. B. Rilascio *in vitro* del resveratrolo puro e del resveratrolo incapsulato nel MCM-48 in soluzione tampone fosfato salino (Summerlin *et al.*, 2016)

4.4.7- Dispersioni solide

È stato messo in evidenza che la solubilità del resveratrolo può essere notevolmente migliorata tramite la creazione di una dispersione solida di resveratrolo su diidrossido di magnesio (RSV@MDH).

Uno studio condotto da Spogli *et al.* (2018) ha confermato il miglioramento nella solubilità del resveratrolo mediante il test di dissoluzione in ambiente gastrico simulato. Il RSV@MDH ha dimostrato di essere significativamente più solubile rispetto al resveratrolo da solo. I test *in vivo* sono stati eseguiti sul coniglio tramite la somministrazione orale di 50 mg/kg di resveratrolo disperso su magnesio diidrossido. Le curve della concentrazione plasmatica di resveratrolo nel tempo a seguito dell'amministrazione sono riportate in **FIGURA 43**. Le variabili farmacocinetiche derivate da questo studio sono riassunte in **TABELLA 6**. Il resveratrolo è assente nel plasma dell'animale prima dell'amministrazione orale (0 minuti), poi viene rapidamente assorbito, raggiungendo un picco di concentrazione massima (C_{max}) tra i 15 e i 30 minuti dopo la somministrazione. La C_{max} è 76,3

ng/mL e 101,3 ng/mL rispettivamente per il resveratrolo e il RSV@MDH. Nell'intervallo tra 30 e 90 minuti dalla somministrazione, la concentrazione plasmatica di resveratrolo nei soggetti trattati con la dispersione su magnesio diidrossido risulta evidentemente maggiore rispetto agli animali trattati con il solo resveratrolo, mentre a 180 minuti il resveratrolo non è più rilevabile nel plasma di entrambi i gruppi di animali. I valori dell'AUC del profilo di concentrazione plasmatica fino al punto temporale delle 3 ore erano rispettivamente di 2698 ng min/mL e 8944 ng min/mL per il resveratrolo e il RSV@MDH. Questi dati dimostrano un aumento della biodisponibilità del resveratrolo del 330%.

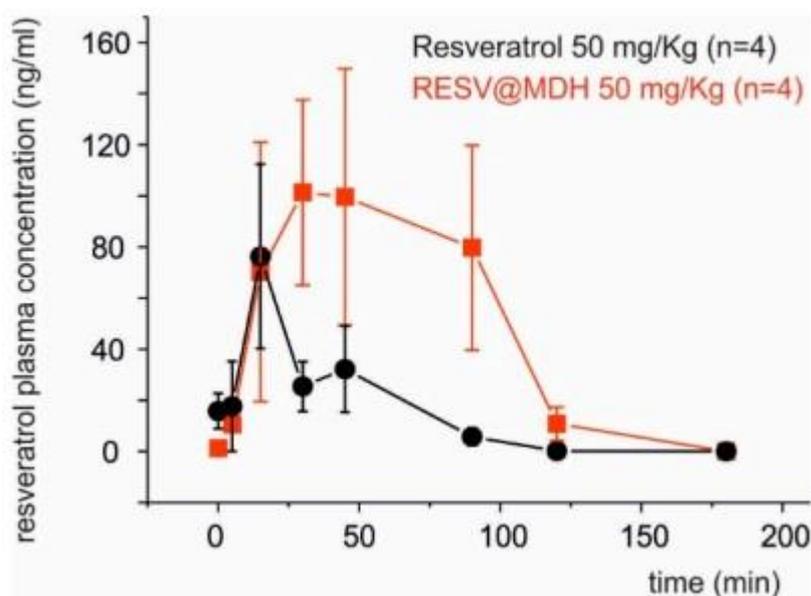


FIGURA 43. Profilo farmacocinetico del resveratrolo dopo somministrazione orale in conigli. Gruppi di 4 animali ciascuno sono stati trattati con resveratrolo 50 mg/kg di resveratrolo puro (linea nera, pallini) e 50 mg/kg di RSV@MDH (linea rossa, quadratini). I campioni di sangue sono stati prelevati in corrispondenza di quadratini e pallini a 0, 5, 15, 30, 45, 90, 120 e 180 minuti. Da: Spogli *et al.* (2018).

TABELLA 6. Parametri farmacocinetici della somministrazione orale di 50 mg/Kg di resveratrolo puro e di RSV@MDH (Spogli *et al.*, 2018).

Parameters	Resveratrolo 50 mg/Kg	Resv@MDH (Resveratrol 50 mg/Kg)	Increase %
AUC (Area Under Curve)	2698 ng min/mL	8944 ng min/mL	330
Time to plasmatic peak	15 min	30 min	200
Peak duration	25 min	105 min	420
Cmax	76.3 ng/mL	101.3 ng/mL	130

Risultati simili sono stati ottenuti anche da Chang *et al.* (2017) attraverso l'incorporazione dell'estratto di buccia d'uva²⁸ (GPE) in un sistema di somministrazione a dispersione solida a

²⁸ GPE concentrato in cui il contenuto di resveratrolo è dichiarato pari a $508 \pm 2 \mu\text{g}/\text{mg}$.

somministrazione orale noto come dripping pill²⁹ (DP) (da ora indicato come GPE-DP), con successivi test *in vivo* sul ratto.

TABELLA 7. Formulazione delle GPE-DP (Chang *et al.*,2017).

Component	Formulations				
	A	B	C	D	E
GPE	5	5	5	5	5
Propylene glycol monocaprylate	9	18	9	9	18
Poloxamer 188	10	10	20	10	20
Polyoxyl 35 castor oil	5	5	5	10	10
PEG 6000	171	162	161	166	147
Total amount (g)	200	200	200	200	200

La dispersione solida è stata formata mescolando GPE, Capryol™ 90, Poloxamer 188, Cremophor® EL e PEG 6000 (TABELLA 7). La formulazione GPE-DP è stata preparata utilizzando il metodo del melt molding³⁰, producendo particelle approssimativamente sferiche con un diametro medio di 3,53±0,08 mm e un contenuto di resveratrolo pari a 1,23% in peso. Inoltre, è stato riscontrato che la formulazione GPE-DP è in grado di mantenersi stabile a una temperatura di 40°C e umidità relativa del 75% per 6 mesi. Le analisi del profilo farmacocinetico condotte *in vivo* hanno rivelato un notevole aumento della biodisponibilità del resveratrolo di circa 11,7 volte, sottolineando inoltre il potenziale del sistema di somministrazione orale DP come una valida opzione per applicazioni cliniche.

4.4.8 - Nanocristalli

Singh *et al.* (2017) hanno condotto uno studio utilizzando il metodo della sonicazione per dimostrare come la nanonizzazione dei principi attivi, con l'ottenimento di nanocristalli, possa costituire un approccio efficace nell'aumentare stabilità fisica e chimica, profilo di dissoluzione e quindi biodisponibilità orale di sostanze, come il resveratrolo, poco solubili e disponibili. I nanocristalli nel caso in questione, sono stati ottenuti utilizzando, oltre alla sostanza in esame, stabilizzanti e un sonicatore.

Il sonicatore è composto da:

- un generatore che converte l'energia elettrica in ultrasuoni a 20 KHz;

²⁹ Si intende una dispersione solida derivata da una combinazione del principio attivo e della matrice attraverso dispersione, gocciolamento e consolidamento allo stato fuso.

³⁰ Questa tecnica richiede che le preparazioni vengano combinate in uno stampo e riscaldate al di sopra della temperatura di transizione vetrosa del polimero (per polimeri amorfi) o della temperatura di fusione (per polimeri semicristallini).

- un trasduttore che trasforma questa energia in vibrazione meccanica longitudinale di uguale frequenza;
- una sonda che aumenta l'ampiezza delle vibrazioni da trasmettere ai prodotti da trattare.

I sonicatori sfruttano l'effetto della cavitazione: quando si generano onde sonore ad alta frequenza in un liquido, si creano zone di alta e bassa pressione (**FIGURA 44**). Durante il ciclo di bassa pressione, si creano bolle di vapore che sono instabili e durano solo alcune frazioni di secondo. Quando le bolle implodono si raggiungono alte pressioni (circa 200 atm) e altissime temperature (5000°K). L'implosione genera turbolenze che separano gli agglomerati di particelle. Variando i parametri del sistema, si riesce ad ottenere l'effetto desiderato, dalla semplice dispersione alla macinazione, dalla disgregazione cellulare alla microemulsione e alla creazione di nanocristalli.

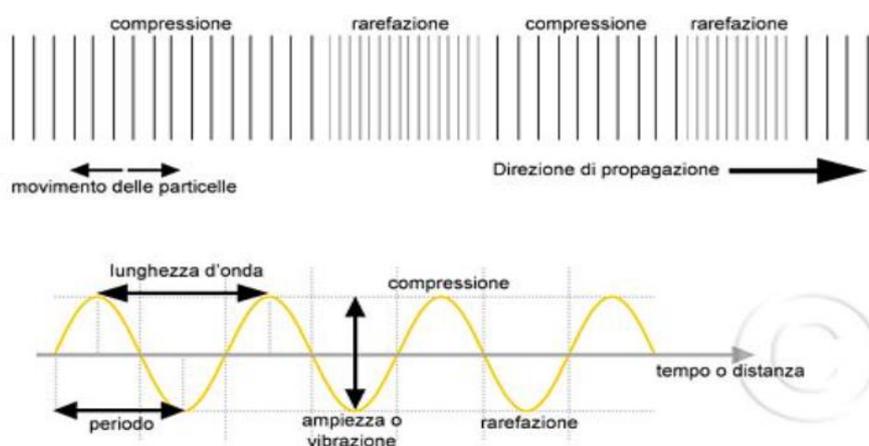


FIGURA 44. La cavitazione, il meccanismo sfruttato dal sonicatore. Da: <https://www.trevenlab.it/ultrasuoni-e-sonicatori.html>

Nella formulazione di Singh e collaboratori (2017) nanocristalli di resveratrolo hanno una morfologia simile a bastoncini con una dimensione di 110 ± 13 nm, come mostrato in **FIGURA 45**; l'efficienza di incapsulamento del resveratrolo è del $94 \pm 2\%$ e la formulazione si è conservata per 3 mesi senza alcun tipo di deterioramento.

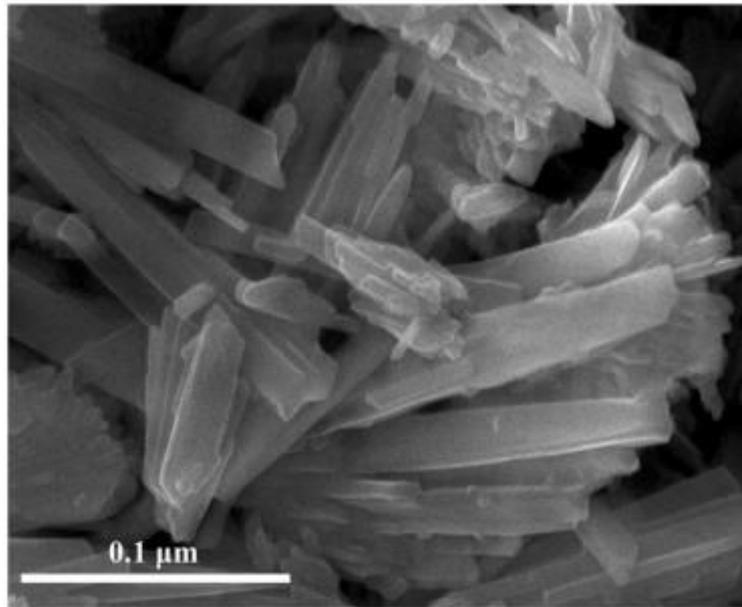


FIGURA 45. Microfotografia acquisita al microscopio elettronico a scansione che mostra la morfologia superficiale dei nanocristalli di resveratrolo (Singh *et al.*, 2017).

Gli studi di dissoluzione *in vitro*, condotti a pH 7,4 e 37°C, dopo 5 ore mostravano che il 95% del resveratrolo nanocristallizzato era stato rilasciato, contro il 40% del resveratrolo immodificato. Per quanto riguarda gli altri parametri farmacocinetici, AUC e C_{max} del resveratrolo sono aumentate rispettivamente di 3,5 e 2,2 volte quando sono stati utilizzati i nanocristalli invece che il composto puro (**FIGURA 46**). Questo miglioramento della biodisponibilità del resveratrolo è imputabile a diversi fattori, come la migliorata dissoluzione e la riduzione dello spessore dello strato di diffusione dovuti alle dimensioni ridotte dei cristalli e l'assorbimento diretto delle particelle attraverso la barriera intestinale.

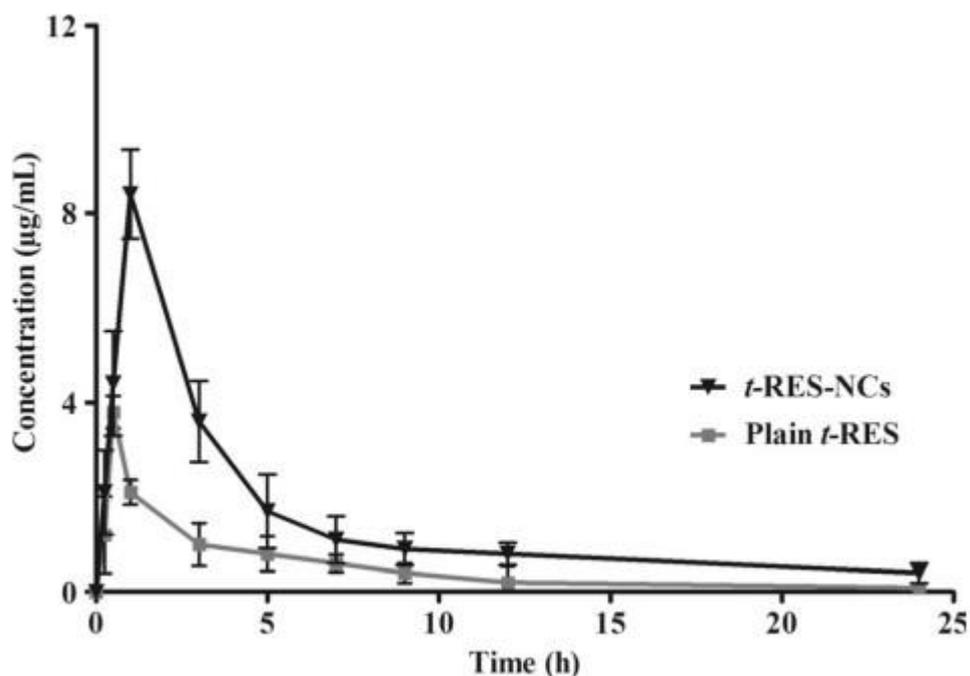


FIGURA 46. Concentrazione plasmatica del resveratrolo dopo somministrazione orale di resveratrolo immodificato e come nanocristalli in ratti Sprague Dawley alla dose di 20 mg/kg. (Singh *et al.*, 2017).

Nello stesso studio sono state valutate anche l'efficacia *in vitro* nei confronti delle cellule di cancro al seno MDA-MB-231 e le proprietà farmacocinetiche *in vivo* dei nanocristalli di trans-resveratrolo. I risultati hanno dimostrato una maggiore citotossicità dei nanocristalli rispetto al resveratrolo immodificato, con un effetto dipendente dalla concentrazione e dal tempo.

4.4.9 - Complessi con ciclodestrine

Uno studio di Soo *et al.* (2016) si pone l'obiettivo di sviluppare e ottimizzare un nuovo veicolo per la somministrazione orale del resveratrolo: incapsulare la molecola pura nei compartimenti lipofili del liposoma e dei complessi ciclodestrina-resveratrolo (da ora in avanti indicato con RSV-CD) nei compartimenti idrofili del liposoma, combinando le due tecnologie (FIGURA 47).

I liposomi di Soo e collaboratori (2016) sono composti da 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolo-3-fosfocolina (DPPC) e colesterolo a una concentrazione di 2 mg/mL. Il complesso di inclusione RSV-CD è formato da 2-idrossipropil- γ -ciclodestrina in un rapporto molare di 2:1 con il resveratrolo. Le dimensioni delle particelle, l'indice di polidispersità e il potenziale ζ della formulazione valgono rispettivamente di 131 ± 1 nm, $0,089 \pm 0,005$ e $-2,6 \pm 0,5$ mV. Inoltre, l'efficienza di incapsulamento del resveratrolo risulta migliorata di circa 4 volte utilizzando questa strategia di doppia incapsulazione rispetto ai liposomi convenzionali. Gli studi sul rilascio condotti su i liposomi contenenti il RSV-CD a pH 7,4 e 37°C per 24 ore mostrano un rilascio praticamente completo del resveratrolo (94%), in confronto al 40% delle forme liposomiali classiche.

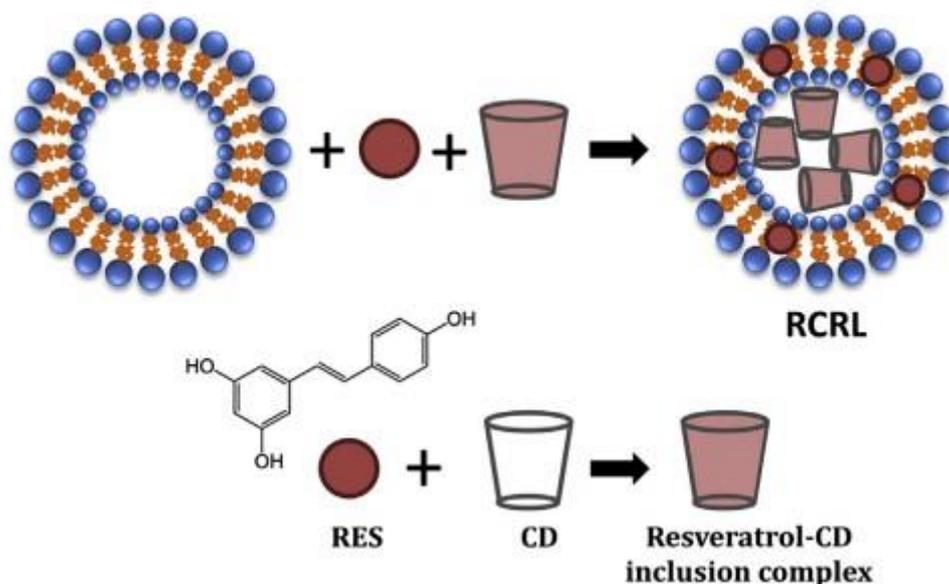


FIGURA 47. Schema della formulazione liposomiale che incorpora il resveratrolo nel doppio strato lipidico e complessi di inclusione RSV-CD nel nucleo acquoso. Da: Soo *et al.* (2016).

La complessazione con la ciclodestrina infatti aumenta la solubilità in acqua del resveratrolo, migliorandone quindi il profilo di dissoluzione. In virtù di questa caratteristica, la tecnologia della complessazione con ciclodestrine è stata combinata anche con altre tecniche di rilascio, ottenendo soluzioni formulative sempre più complesse.

Nello studio viene anche testata *in vitro* la citotossicità dei liposomi RSV-CD in una linea cellulare di cancro al colon (HT-29) che risulta migliorato rispetto al resveratrolo libero e correlato direttamente con la dose somministrata, confermando questa tecnica di duplice incapsulazione come una valida opzione nel miglioramento della biodisponibilità del resveratrolo.

Le strategie di doppia incapsulazione come quella appena descritta consentono un aumento del carico di resveratrolo, rispetto alle formulazioni convenzionali, e inoltre offrono la possibilità di effettuare modifiche superficiali per migliorare le prestazioni *in vivo* del sistema, ad esempio il targeting specifico delle cellule, l'assorbimento cellulare o la clearance.

5 - Discussione e conclusioni

Come discusso in questo elaborato, sono state sviluppate diverse strategie per migliorare la disponibilità del resveratrolo. Gli studi condotti finora hanno dimostrato che l'aumento della solubilità del resveratrolo, con saturazione parziale del suo metabolismo, portano a un miglioramento della sua biodisponibilità. Gli esempi di formulazioni riportati nel capitolo precedente mostrano che gli incapsulamenti in nanoparticelle lipidiche solide, liposomi, emulsioni, micelle, così come l'inclusione in nanoparticelle polimeriche, contribuiscono a migliorare l'assorbimento e la stabilità del resveratrolo.

Le formulazioni basate su lipidi invece presentano alcune limitazioni: i rischi sono una capacità di solubilizzazione limitata, a meno che i componenti attivi siano altamente lipofili, e una stabilità ridotta dei componenti attivi all'interno dei sistemi liposomiali e nanoparticellari (Yechezkel, 2001). Inoltre, l'incapsulamento del farmaco in una matrice lipidica può ridurre la quantità di farmaco caricata e richiedere dosi più elevate per ottenere gli effetti terapeutici desiderati.

L'uso di nanoparticelle come veicoli di trasporto presenta questioni aggiuntive, come la capacità di attraversare le membrane biologiche, inclusa la barriera ematoencefalica, e qualsiasi modifica deve essere attentamente valutata e testata per evitare una diminuzione dell'emivita dovuta alla risposta del sistema immunitario nel fegato e nella milza. I macrofagi infatti possono assorbire le nanoparticelle con dimensioni comprese tra 100 nm e 1000 nm ma le nanoparticelle più piccole di 100 nm possono essere assorbite dalle cellule attraverso l'endocitosi incorrendo nel potenziale rischio di causare tossicità inaspettate se la loro distribuzione non è controllata. Qualche scrupolo viene anche dalla consapevolezza che i materiali utilizzati nella preparazione delle nanoparticelle, seppure biocompatibili e non tossici, spesso non sono endogeni per l'essere umano. Altri dubbi sorgono dalla difficoltà di riprodurre la sintesi di nanoparticelle su una scala necessaria per la commercializzazione e dalla mancanza di comprensione su come le superfici "nano" interagiscano con le superfici biologiche, ma anche dalla mancanza di piattaforme tecnologiche funzionali ad analizzare grandi quantità di nanoparticelle e, come già sottolineato, alla conoscenza insufficiente sul destino delle nanoparticelle una volta che entrano negli organi, nei tessuti e nelle cellule (Watkins *et al.*, 2015).

Le dispersioni solide rappresentano un'alternativa interessante poiché la manipolazione dei trasportatori e delle proprietà della polvere dei componenti attivi può migliorare la solubilità, la dissoluzione e persino l'assorbimento di sostanze con le caratteristiche chimiche del resveratrolo. La biodisponibilità può essere ulteriormente migliorata controllando il peso molecolare, la composizione del veicolo o lo stato cristallino e la porosità della polvere dei componenti attivi (Vasconcelos *et al.*, 2007). Tuttavia, una limitazione all'applicazione terapeutica delle dispersioni solide è l'instabilità

termodinamica delle molecole nello stato amorfo che può portare a cristallizzazioni indesiderate del farmaco durante la conservazione.

La creazione di nanocristalli stabili tramite nanonizzazione rappresenta una strategia molto promettente per migliorare la solubilità, la velocità di dissoluzione, la stabilità fisica e chimica e, infine, la biodisponibilità orale *in vivo* di farmaci insolubili in acqua, come discusso nell'esempio della formulazione di Singh *et al.* (2017). I nanocristalli presentano anche i vantaggi di essere una preparazione semplice, avere costi di produzione contenuti e minori effetti collaterali derivanti dagli eccipienti (Liu *et al.*, 2017). D'altro canto, a causa dell'elevata energia superficiale libera, i nanocristalli tendono a formare agglomerati e richiedono l'uso di stabilizzanti che possono adsorbirsi sulla superficie delle particelle per generare forze repulsive e stabilizzare la formulazione, sia tramite interazioni steriche che elettrostatiche.

5.1 – Considerazioni finali

L'uomo si è dotato nel corso dell'evoluzione di sistemi di detossificazione rispetto a tutte quelle sostanze non-self e i citocromi sono una delle nostre armi più affinate. Dalla riflessione sulla biodisponibilità del resveratrolo, così scarsa proprio a causa di questi meccanismi di protezione, sorge il timore che l'utilizzo smodato come integratori alimentari di sostanze come il resveratrolo ingegnerizzato *ad hoc* per bypassare il fisiologico processo di metabolizzazione possa scatenare tutta una serie di reazioni inaspettate e imprevedibili, manifestazioni di tossicità sconosciute.

È doveroso quindi ribadire la necessità di ulteriori studi per comprendere a fondo ogni aspetto di ogni formulazione, galenicamente più o meno complessa, per fornire prodotti sicuri ed efficaci ma anche per quanto riguarda la qualità dell'informazione che il farmacista fornisce in qualità di figura di riferimento nella dispensazione di prodotti come integratori alimentari, altri fitopreparati e addirittura cosmetici a base di resveratrolo.

Certamente vantaggi e limiti delle metodiche elencate in questo elaborato sono ben documentati dagli studi e questo è positivo, in particolar modo per il campo "farmaco". La speranza infatti è che resveratrolo armato di queste tecnologie diventi presto una nuova arma al servizio della salute, come farmaco o coadiuvante alle terapie in ambiti clinici come l'oncologia, la cardiologia, la neurologia e tutti gli altri ambiti già presi in considerazione.

BIBLIOGRAFIA

- Abba Y, Hassim H, Hamzah H, Noordin MM. Antiviral Activity of Resveratrol against Human and Animal Viruses. *Adv Virol*. 2015;2015:184241. doi: 10.1155/2015/184241. Epub 2015 Nov 29. PMID: 26693226; PMCID: PMC4676993
- Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcão A, Soares E, Costa R, Loureiro AI, Fernandes-Lopes C, Rocha JF, Nunes T, Wright L, Soares-da-Silva P. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res*. 2009 May;53 Suppl 1:S7-15. doi: 10.1002/mnfr.200800177. PMID: 19194969
- Arora I, Sharma M, Tollefsbol TO. Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 14;20(18):4567. doi: 10.3390/ijms20184567. PMID: 31540128; PMCID: PMC6769666
- Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Bano MC, Obrador E, Estrela JM. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med*. 2002 Aug 1;33(3):387-98
- Atanacković M, Posa M, Heinle H, Gojković-Bukarica L, Cvejić J. Solubilization of resveratrol in micellar solutions of different bile acids. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009 Aug 1;72(1):148-54. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.03.029. Epub 2009 Apr 5. PMID: 19411167
- Basavaraj S, Betageri GV. Improved oral delivery of resveratrol using proliposomal formulation: investigation of various factors contributing to prolonged absorption of unmetabolized resveratrol. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014 Apr;11(4):493-503. doi: 10.1517/17425247.2014.878701. Epub 2014 Jan 24. PMID: 24456117
- Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precis Oncol*. 2017;1:35. doi: 10.1038/s41698-017-0038-6. Epub 2017 Sep 25. PMID: 28989978; PMCID: PMC5630227
- Blanchard OL, Friesenhahn G, Javors MA, Smoliga JM (2014) Development of a Lozenge for Oral Transmucosal Delivery of *Trans*-Resveratrol in Humans: Proof of Concept. *PLoS ONE* 9(2): e90131
- Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, Booth TD, Crowell JA, Perloff M, Gescher AJ, Steward WP, Brenner DE. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jun;16(6):1246-52. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0022. PMID: 17548692
- Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem*. 2002 May 22;50(11):3337-40. doi: 10.1021/jf0112973. PMID: 12010007
- Calvo-Castro LA, Schiborr C, David F, Ehrt H, Voggel J, Sus N, Behnam D, Bosy-Westphal A, Frank J. The Oral Bioavailability of Trans-Resveratrol from a Grapevine-Shoot Extract in Healthy Humans is Significantly Increased by Micellar Solubilization. *Mol Nutr Food Res*. 2018 May;62(9):e1701057. doi: 10.1002/mnfr.201701057. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29534330

- Capasso F, Grandolini G, Izzo AA, Fitoterapia - Impiego razionale delle droghe vegetali. --: Springer-Verlag Italia, 2006
- Chachay VS, Macdonald GA, Martin JH, Whitehead JP, O'Moore-Sullivan TM, Lee P, et al. Resveratrol does not benefit patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014; 12: 2092–2103 e1–6
- Chang CW, Wong CY, Wu YT, Hsu MC. Development of a Solid Dispersion System for Improving the Oral Bioavailability of Resveratrol in Rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2017 Apr;42(2):239-249. doi: 10.1007/s13318-016-0339-0. PMID: 27118361
- Chedea VS, Vicaș SI, Sticozzi C, Pessina F, Frosini M, Maioli E, Valacchi G. Resveratrol: from diet to topical usage. *Food Funct.* 2017 Nov 15;8(11):3879-3892. doi: 10.1039/c7fo01086a. PMID: 29034918
- Chen J, Bai Q, Zhao Z, Sui H, Xie X. Resveratrol improves delayed r-tPA treatment outcome by reducing MMPs. *Acta Neurol Scand.* 2016 Jul;134(1):54-60. doi: 10.1111/ane.12511. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26455907
- Chen S, Zhao X, Ran L, Wan J, Wang X, Qin Y, Shu F, Gao Y, Yuan L, Zhang Q, Mi M. Resveratrol improves insulin resistance, glucose and lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Dig Liver Dis.* 2015 Mar;47(3):226-32. doi: 10.1016/j.dld.2014.11.015. Epub 2014 Dec 16. PMID: 25577300
- Chimento A, De Amicis F, Sirianni R, Sinicropi MS, Puoci F, Casaburi I, Saturnino C, Pezzi V. Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 19;20(6):1381. doi: 10.3390/ijms20061381. PMID: 30893846; PMCID: PMC6471659.
- Cottart, C.-H., Nivet-Antoine, V., Laguillier-Morizot, C. and Beaudeau, J.-L. (2010), Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54: 7-16
- Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci.* 2004 Dec;82(2):614-9. doi: 10.1093/toxsci/kfh263. Epub 2004 Aug 25. PMID: 15329443
- Di Massimo F., 2019- 2020. Biodisponibilità dei composti fenolici: resveratrolo, curcumina, catechine e silimarina. Università degli studi Niccolò Cusano - Telematica Roma
- Di Pierro Francesco, Argomenti di fitoterapia farmaceutica, CEC Editore, 2014. ISBN: 9788890521928
- Firenzuoli Fabio, Fitoterapia. Guida all'uso clinico delle piante medicinali. Milano: Elsevier, 2009
- Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas-Bargues C, Abdelaziz KM, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borrás C. Properties of Resveratrol: *In vitro* and *In vivo* Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:837042. doi: 10.1155/2015/837042. Epub 2015 Jun 28. PMID: 26221416; PMCID: PMC4499410
- Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem.* 2003 Feb;36(1):79-87. doi: 10.1016/s0009-9120(02)00397-1. PMID: 12554065

- Jaya Sravani Vankayala, Surendra Nath Battula, Ruckmani Kandasamy, Gover Antoniraj Mariya, Magdaline Eljeeva Emerald Franklin, Heartwin Amaladhas Pushpadass, Laxmana Naik Naik, Surfactants and fatty alcohol based novel nanovesicles for resveratrol: Process optimization, characterization and evaluation of functional properties in RAW 264.7 macrophage cells, *Journal of Molecular Liquids*, Volume 261, 2018, Pages 387-396, ISSN 0167-7322
- Jayesh Kumar Bhatt, Sabin Thomas, Moola Joghee Nanjan, Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus, *Nutrition Research*, Volume 32, Issue 7, 2012, Pages 537-541, ISSN 0271-5317
- Johnson JJ, Nihal M, Siddiqui IA, Scarlett CO, Bailey HH, Mukhtar H, Ahmad N. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Aug;55(8):1169-76. doi: 10.1002/mnfr.201100117. Epub 2011 Jun 29. PMID: 21714124; PMCID: PMC3295233
- Kalita, Bhupen. (2015). Resveratrol-phospholipid complexes (phytosomes) with improved physicochemical properties favorable for drug delivery via skin. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4. 1497-1517.
- Kidd PM. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern Med Rev*. 2009 Sep;14(3):226-46. PMID: 19803548
- Lemke T.L., Zito S.W., Roche V.F., Williams D.A., Foye's l'essenziale - principi di chimica farmaceutica. Edizione italiana a cura di A. Chilin, G. Zagotto. Ed. 2017, Piccin Nuova Libreria S.p.a., Padova
- Li B, Yao Q, Pan X, et al. (2020). Resveratrol ameliorates inflammatory damage and protects against osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports*, 22(5), 3767-3777. doi: 10.3892/mmr.2020.11404
- Lin SC, Ho CT, Chuo WH, Li S, Wang TT, Lin CC. Effective inhibition of MERS-CoV infection by resveratrol. *BMC Infect Dis*. 2017 Feb 13;17(1):144. doi: 10.1186/s12879-017-2253-8. PMID: 28193191; PMCID: PMC5307780
- Liu L, Geng J, Zhao H, et al. (2018). Protective effect of resveratrol against liver injury in septic rats via the inhibition of TNF- α , NF- κ B, and SIRT1/TLR4 signaling. *Inflammation*, 41(3), 1010-1020. doi: 10.1007/s10753-017-0745-3
- Liu T, Yao G, Liu X, Yin H. Preparation Nanocrystals of Poorly Soluble Plant Compounds Using an Ultra-Small-Scale Approach. *AAPS PharmSciTech*. 2017 Oct;18(7):2610-2617. doi: 10.1208/s12249-017-0742-0. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28243886
- Lu R, Serrero G. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 1999 Jun;179(3):297-304
- Machado ND, Fernández MA, Díaz DD. Recent Strategies in Resveratrol Delivery Systems. *Chempluschem*. 2019 Jul;84(7):951-973. doi: 10.1002/cplu.201900267. PMID: 31943987.
- McCreary MR, Schnell PM, Rhoda DA. Randomized Double-blind Placebo-controlled Proof-of-concept Trial of Resveratrol for Outpatient Treatment of Mild Coronavirus Disease (COVID-19). *Res Sq [Preprint]*. 2021 Sep 13:rs.3.rs-861831. doi: 10.21203/rs.3.rs-861831/v1. Update in: *Sci Rep*. 2022 Jun 29;12(1):10978. PMID: 34545357; PMCID: PMC8452104

- Nassir AM, Shahzad N, Ibrahim IAA, Ahmad I, Md S, Ain MR. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles mediated programmed cell death in prostate cancer cells. *Saudi Pharm J*. 2018 Sep;26(6):876-885. doi: 10.1016/j.jsps.2018.03.009. Epub 2018 Mar 15. PMID: 30202231; PMCID: PMC6128707
- Otake Y, Nolan AL, Walle UK, Walle T. Quercetin and resveratrol potently reduce estrogen sulfotransferase activity in normal human mammary epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000 Jul-Aug;73(5):265-70. doi: 10.1016/s0960-0760(00)00073-x. PMID: 11070355
- P. Langcake, Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene, *Physiological Plant Pathology*, Volume 18, Issue 2, 1981, Pages 213-226, ISSN 0048-4059
- P.W. Parodi, The French paradox unmasked: the role of folate, *Medical Hypotheses*, Volume 49, Issue 4, 1997, Pages 313-318, ISSN 0306-9877
- Peñalva R, Morales J, González-Navarro CJ, Larrañeta E, Quincoces G, Peñuelas I, Irache JM. Increased Oral Bioavailability of Resveratrol by Its Encapsulation in Casein Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 18;19(9):2816. doi: 10.3390/ijms19092816. PMID: 30231546; PMCID: PMC6163610
- Ramírez-Garza SL, Laveriano-Santos EP, Marhuenda-Muñoz M, Storniolo CE, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventós RM. Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials. *Nutrients*. 2018 Dec 3;10(12):1892. doi: 10.3390/nu10121892. PMID: 30513922; PMCID: PMC6317057
- Ranjbar A, Jamshidi M, Torabi S. Molecular modelling of the antiviral action of Resveratrol derivatives against the activity of two novel SARS CoV-2 and 2019-nCoV receptors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Jul;24(14):7834-7844. doi: 10.26355/eurrev_202007_22288. PMID: 32744711
- Riccio BVF, Spósito L, Carvalho GC, Ferrari PC, Chorilli M. Resveratrol isoforms and conjugates: A review from biosynthesis in plants to elimination from the human body. *Arch Pharm*. 2020;353:e2000146
- Sessa M, Balestrieri ML, Ferrari G, Servillo L, Castaldo D, D'Onofrio N, Donsì F, Tsao R. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. *Food Chem*. 2014 Mar 15;147:42-50. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.088. Epub 2013 Sep 25. PMID: 24206683
- Sessa M, Tsao R, Liu R, Ferrari G, Donsì F. Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion. *J Agric Food Chem*. 2011 Dec 14;59(23):12352-60. doi: 10.1021/jf2031346. Epub 2011 Nov 11. PMID: 22026647
- Singh S, Tripathi JS, Rai NP. An appraisal of the bioavailability enhancers in Ayurveda in the light of recent pharmacological advances. *AYU* 2016;37:3-10
- Singh SK, Makadia V, Sharma S, Rashid M, Shahi S, Mishra PR, Wahajuddin M, Gayen JR. Preparation and in-vitro/in-vivo characterization of trans-resveratrol nanocrystals for oral administration. *Drug Deliv Transl Res*. 2017 Jun;7(3):395-407. doi: 10.1007/s13346-017-0362-y. PMID: 28194730

- Siu FY, Ye S, Lin H, Li S. Galactosylated PLGA nanoparticles for the oral delivery of resveratrol: enhanced bioavailability and in vitro anti-inflammatory activity. *Int J Nanomedicine*. 2018 Jul 13;13:4133-4144. doi: 10.2147/IJN.S164235. PMID: 30038494; PMCID: PMC6049601
- Soo E, Thakur S, Qu Z, Jambhrunkar S, Parekh HS, Popat A. Enhancing delivery and cytotoxicity of resveratrol through a dual nanoencapsulation approach. *J Colloid Interface Sci*. 2016 Jan 15;462:368-74. doi: 10.1016/j.jcis.2015.10.022. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26479200
- Spogli R, Bastianini M, Ragonese F, Iannitti RG, Monarca L, Bastioli F, Nakashidze I, Brecchia G, Menchetti L, Codini M, Arcuri C, Mancinelli L, Fioretti B. Solid Dispersion of Resveratrol Supported on Magnesium DiHydroxide (Resv@MDH) Microparticles Improves Oral Bioavailability. *Nutrients*. 2018 Dec 5;10(12):1925. doi: 10.3390/nu10121925. PMID: 30563110; PMCID: PMC6315708
- Su M, Dong C, Wan J, Zhou M. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of trans-resveratrol-3-O-glucoside and its two metabolites in rats. *Phytomedicine*. 2019 May;58:152882. doi: 10.1016/j.phymed.2019.152882. Epub 2019 Mar 13. PMID: 30901659
- Summerlin N, Qu Z, Pujara N, Sheng Y, Jambhrunkar S, McGuckin M, Popat A. Colloidal mesoporous silica nanoparticles enhance the biological activity of resveratrol. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Aug 1;144:1-7. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.076. Epub 2016 Mar 26. PMID: 27060664
- Susilawati Y, Chaerunisa AY, Purwaningsih H. Phytosome drug delivery system for natural cosmeceutical compounds: Whitening agent and skin antioxidant agent. *J Adv Pharm Technol Res* 2021;12:327-34
- Takaoka, M.J. (1940) Of the Phenolic Substances of White Hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loe. fil.). *J Faculty Sci Hokkaido Imperial University*, 3, 1-16
- Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, García-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2012 Aug 1;110(3):356-63. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.03.030. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22520621
- Urpí-Sardà M, Jáuregui O, Lamuela-Raventós RM, Jaeger W, Miksits M, Covas MI, Andres-Lacueva C. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2005 May 15;77(10):3149-55. doi: 10.1021/ac0484272. PMID: 15889903
- Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today*. 2007 Dec;12(23-24):1068-75. doi: 10.1016/j.drudis.2007.09.005. Epub 2007 Oct 30. PMID: 18061887
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*. 2004 Dec;32(12):1377-82. doi: 10.1124/dmd.104.000885. Epub 2004 Aug 27. PMID: 15333514
- Walle T., Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jan;1215:9-15. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x. PMID: 21261636

- Wan S, Zhang L, Quan Y, Wei K. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles: enhanced stability, solubility and bioactivity of resveratrol for non-alcoholic fatty liver disease therapy. *R Soc Open Sci.* 2018 Nov 14;5(11):181457. doi: 10.1098/rsos.181457. Erratum in: *R Soc Open Sci.* 2019 Jan 16;6(1):182173. PMID: 30564426; PMCID: PMC6281916
- Watkins R, Wu L, Zhang C, Davis RM, Xu B. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. *Int J Nanomedicine.* 2015 Sep 28;10:6055-74. doi: 10.2147/IJN.S92162. PMID: 26451111; PMCID: PMC4592057
- Wenzel, E. and Somoza, V. (2005), Metabolism and bioavailability of *trans*-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 472-481
- Yang FF, Zhou J, Hu X, Cong ZQ, Liu CY, Pan RL, Chang Q, Liu XM, Liao YH. Improving oral bioavailability of resveratrol by a UDP-glucuronosyltransferase inhibitory excipient-based self-microemulsion. *Eur J Pharm Sci.* 2018 Mar 1;114:303-309. doi: 10.1016/j.ejps.2017.12.026. Epub 2017 Dec 30. PMID: 29292019
- Yechezkel Barenholz, Liposome application: problems and prospects, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Volume 6, Issue 1, 2001, Pages 66-77, ISSN 1359-0294
- Yen, C.C.; Chang, C.W.; Hsu, M.C.; Wu, Y.T. Self-nanoemulsifying drug delivery system for resveratrol: Enhanced oral bioavailability and reduced physical fatigue in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1853
- Yoshihiro Higashi, Kentaro Higashi, Asami Mori, Kenji Sakamoto, Kunio Ishii, Tsutomu Nakahara, Anti-cataract Effect of Resveratrol in High-Glucose-Treated Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2018, Volume 41, Issue 10, Pages 1586-1592, Released on J-STAGE October 01, 2018
- Yujiao Zu, Haley Overby, Guofeng Ren, Zhaoyang Fan, Ling Zhao, Shu Wang, Resveratrol liposomes and lipid nanocarriers: Comparison of characteristics and inducing browning of white adipocytes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 164, 2018, Pages 414-423, ISSN 0927-7765
- Zhang C, Yuan W, Fang J, Wang W, He P, et al. (2016) Efficacy of Resveratrol Supplementation against Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis of Placebo-Controlled Clinical Trials. *PLOS ONE* 11(8): e0161792
- Zhang Y, Yuan Y, Jin Z, Zhang L, et al. (2019). Polydatin alleviates small intestine injury during hemorrhagic shock as a SIRT1 activator. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 7048291. doi: 10.1155/2019/7048291

SITOGRAFIA

<https://eur-lex.europa.eu>

<https://www.ism.cnr.it/it/tempism/analisi/spettroscopia/laboratori-di-spettroscopia/spettroscopia-infrarossa-a-trasformata-di-fourier-ftir.html>

<https://www.issalute.it>

<https://www.issmc.cnr.it/ricerca/risorse/funzionalizzazione-e-trattamento-polveri/sonda-a-ultrasuoni/>

<https://www.salute.gov.it/portale/home.html>

<https://www.trevenlab.it/ultrasuoni-e-sonicatori.html>