

# HPTLC DENSITOMETRICA PER IL CONTROLLO DI QUALITÀ DEI PRODOTTI PER LA SALUTE A BASE DI PIANTE

Francesca Romana Gallo, Giuseppina Multari, Giovanna Palazzino  
Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

Le piante e i loro derivati possono costituire sostanze attive presenti in molti prodotti naturali utilizzati per la salute umana, dai medicinali agli integratori alimentari, ai nutraceutici fino ai dispositivi medici. Ognuna di queste categorie di prodotti è regolamentata da una legislazione propria. Ad esempio un integratore, dal punto di vista normativo, non è un farmaco, ma un alimento e quindi non può contenere sostanze farmacologicamente attive. A tal proposito un richiamo è doveroso alla definizione che ne fanno le due normative italiane che regolano queste due categorie di prodotti.

La legislazione sui prodotti medicinali è regolata dal DL.vo 219 del 2006, che definisce medicinale “ogni sostanza o associazione di sostanze”, anche di origine vegetale, “presentata come avente proprietà curative o profilattiche delle malattie umane da somministrare all’uomo allo scopo di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche” (che possono supporre alterate), “esercitando un’azione farmacologica, immunologica o metabolica” (1).

La definizione di integratore alimentare data nel DL.vo 169 del 2004 recita così: “sono prodotti alimentari destinati a integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare, ma non in via esclusiva, aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate” (2).

Nell’ambito dei prodotti integratori alimentari sono però escluse le piante con una chiara attività farmacologica e sono ammesse solo le piante riportate nell’Allegato 1 del Decreto del Ministero della Salute DM 10 agosto 2018 (3) sulla “disciplina dell’impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali”, aggiornato con Decreto dirigenziale del 9 gennaio 2019 e poi con Decreto del 26 luglio 2019.

Nell’Allegato aggiornato al 2019 sono state aggiunte nell’ultima colonna le “Linee guida ministeriali di riferimento per gli effetti fisiologici” che non fanno parte integrante del predetto Decreto del 2018, precisando nella premessa che tali effetti, impiegabili in attesa della definizione dei *claims* sui *botanical*, sono volti a ottimizzare le funzioni dell’organismo nell’ambito dell’omeostasi secondo il modello definito dal Consiglio d’Europa (47).

Andando a considerare i dati sulle vendite dei prodotti per la salute degli ultimi tempi, si è potuto notare che nel periodo luglio 2019-giugno 2020 è il canale delle farmacie e parafarmacie online, in particolare, ad aver avuto un incremento di fatturato del 53,6% rispetto allo stesso periodo nell’anno precedente. Soprattutto le vendite di integratori hanno registrato un incremento del 34% nel primo semestre 2020 e addirittura dell’80,3% nel solo mese di giugno 2020 rispetto allo stesso periodo del 2019, in controtendenza rispetto a quanto rilevato nel canale offline (4).

Ogni integratore, venduto online o in un negozio fisico, secondo il DL.vo 169 del 2004 (2) deve avere un’etichetta che contenga: il nome del prodotto; l’elenco degli ingredienti; il termine

minimo di conservazione; le istruzioni per l'uso (compresa la dose raccomandata giornaliera); una dichiarazione nutrizionale (ovvero l'indicazione dei tenori per dose massima giornaliera dei vari ingredienti); le avvertenze che gli integratori non vanno intesi come sostituti di una dieta variata e che i prodotti devono essere tenuti fuori dalla portata dei bambini; l'effetto nutritivo o fisiologico attribuito al prodotto sulla base dei suoi costituenti in modo idoneo a orientare correttamente le scelte dei consumatori.

Il Regolamento 1924/2006 stabilisce le regole per l'utilizzo delle indicazioni nutrizionali e di salute tramite i *claims*, cioè le frasi indicanti le proprietà salutistiche che possono essere proposte sulle etichette degli alimenti oppure nella pubblicità (5).

Tuttavia, in rete, da siti di vendite online, si possono acquistare centinaia di preparati che dichiarano disparate proprietà benefiche, a volte non veritiere. Inoltre, i prodotti acquistati su Internet, che spesso costituisce una vetrina per prodotti italiani ed esteri, non sempre riportano le descrizioni in italiano. Alcuni di questi siti, ponendosi come semplice "vetrina" per il produttore, non ritengono che spetti a loro la responsabilità, di rendere pubbliche le indicazioni obbligatorie per legge, spetti a loro. Acquistando integratori o farmaci in rete da siti non attendibili, quindi, si può incorrere in molti rischi, *in primis* quello di acquistare prodotti falsificati, che invece delle sostanze dichiarate contengono sostanze parenti o vietate o adulteranti. Per gli integratori in particolare si rischia di trovare preparati con sostanze farmacologicamente attive o con sostanze, ad esempio quelle vegetali, che in Italia non sono ammesse e con le relative potenziali serie ripercussioni sulla salute. Non dimentichiamo poi che, se alcuni siti hanno la grave pecca di vendere integratori privi di descrizioni appropriate, molti altri descrivono il loro prodotto con proprietà e caratteristiche che non gli appartengono.

Per evitare problemi è opportuno rivolgersi ai canali classici: la farmacia, la parafarmacia, la grande distribuzione, oppure siti di vendita online italiani che siano riconosciuti attendibili. Per i farmaci acquistati online un sito autorizzato alla vendita deve avere come requisito sia la presenza di un negozio fisico nel territorio italiano sia il "bollino" di garanzia cioè un bollino con un logo apposito che rimanda tramite link all'elenco pubblicato sul sito del Ministero della Salute di siti riconosciuti e validati per questa attività. Questo logo permette di procurarsi online in modo sicuro un farmaco, ma anche altri prodotti normalmente acquistabili in farmacia (6).

## Sistema di allerta

Per gli integratori alimentari non conformi alla Direttiva 2002/46/CE (7) o che danno "problemi" a livello europeo, ci si deve riferire al Sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF), un network costituito tra le autorità sanitarie dei Paesi membri dell'Unione Europea, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (European Food Safety Authority, EFSA) e la Commissione Europea. Il RASFF permette agli Stati membri e alle istituzioni europee di essere costantemente informati sulla presenza di rischi alimentari sul territorio, e conseguentemente prendere provvedimenti in situazioni di emergenza. Le segnalazioni condivise attraverso il RASFF vengono rese pubbliche e consultabili attraverso un sito web dedicato, il RASFF portal (8).

Nell'anno 2019 sono pervenute 4000 notifiche di cui 3506 hanno riguardato l'alimentazione umana, 322 l'alimentazione animale e 172 i materiali e oggetti destinati a venire a contatto con gli alimenti. Le segnalazioni che hanno coinvolto i prodotti dietetici e gli integratori alimentari sono state 339. Le principali irregolarità hanno riguardato le sostanze non autorizzate comprese nella voce "composizione" (in particolare sostanze ad attività farmacologica), seguite da *novel food* non autorizzati. In alcuni prodotti sono state riscontrate più irregolarità. Come si può vedere

in un documento pubblicato dal Ministero della Salute (9), le segnalazioni hanno riguardato in particolare 57 prodotti di origine USA, 45 Cina (45) e 36 Regno Unito.

In Italia nel sito “Epicentro” dell’Istituto Superiore di Sanità, dedicato all’epidemiologia per la sanità pubblica, è presente la pagina sulla Fitosorveglianza da cui si può accedere al portale VigiErbe ([www.vigierbe.it](http://www.vigierbe.it)) dove segnalare, online, le sospette reazioni avverse che si verificano dopo l’assunzione di prodotti di origine naturale, di integratori alimentari a base vegetale, di prodotti erboristici e altri (10).

## Caso Chaparral

Fatte queste premesse viene presentato un caso connesso ai problemi sopraesposti. In seguito a una denuncia da parte di un consumatore per aver avuto seri problemi epatici dopo l’assunzione di un prodotto denominato “Chaparral”, acquistato su Internet da un famoso sito di vendite online, il campione “incriminato” è stato posto sotto sequestro dai Nuclei Antisofisticazioni e Sanità (NAS), che hanno fatto richiesta di analisi chimico-fisiche all’Istituto Superiore di Sanità.

Da una prima verifica è emerso che il nominativo Chaparral non era presente nel Registro degli integratori alimentari per prodotto aggiornato al 01/06/2020 presso il Ministero della Salute, né era ritrovato nel Registro transitorio degli integratori per prodotto aggiornato al 15/01/2020 per cui, anche se apparentemente ne avesse le caratteristiche, il prodotto non risultava tra gli integratori venduti in Italia (11).

Per Chaparral, nome comune nella medicina tradizionale, s’intende il cespuglio di creosoto, o legno grasso negli Stati Uniti, *gubernadora* o *hediondilla* in Messico. Il nome botanico della pianta è *Larrea tridentata* Coult o (DC) Cov., sinonimo *Larrea mexicana* Moric, appartenente alla Famiglia delle *Zygophyllaceae*, un arbusto sempreverde che cresce nelle aree desertiche del continente americano. In particolare è abbondante nelle aree desertiche degli Stati messicani come San Luis Potosi, Coahuila, Chihuahua, Durango, Sonora, Zacatecas, Baja California Norte e Sur, e negli stati sud-occidentali degli Stati Uniti come Arizona, California, Nevada, Texas e Nuovo Messico (12).

Il cespuglio di creosoto è una pianta con una lunga storia di uso medicinale. Molte tribù indigene del Nord America hanno utilizzato estratti e preparazioni di questa pianta per trattare un’ampia varietà di disturbi tra cui varicella, piaghe della cute, diabete, cancro, malattie sessualmente trasmissibili, tubercolosi, raffreddore. Gli usi della pianta come antimicrobico, per i sintomi premestruali delle donne, allergie, malattie autoimmuni e reumatismi sono ancora presenti in diverse culture indigene. Il Chaparral tè è comunemente usato per trattare i calcoli della cistifellea e renali (12, 13).

Il creosoto è una ricca fonte di sostanze naturali, circa il 50% del peso delle foglie essiccate è estraibile. Le foglie sono lucide con uno spesso rivestimento resinoso, che emana un forte odore e ha un sapore aspro. La resina che copre le foglie è costituita da molteplici agliconi di flavonoidi, oli essenziali, alcaloidi e diversi lignani. Tra questi ultimi, in particolare, l’acido nordiidroguaiaretico (NDGA). L’NDGA rappresenta circa il 5-10% del peso secco delle foglie e corrisponde all’80% di tutti i fenoli nella resina (12).

L’NDGA e altri fenoli della superficie fogliare nella pianta hanno la funzione di agenti antimicrobici e di protezione contro fattori biotici (erbivori, insetti, ecc.) e abiotici (radiazioni UV, perdita d’acqua) (14, 15).

L’NDGA è un composto naturale con varie proprietà biologiche, ma la sicurezza e l’eventuale tossicità per un uso terapeutico devono ancora essere vagliate tramite studi clinici. Tra le proprietà medicinali proposte per NDGA ci sono quelle dovute alla sua attività come antiossidante (16, 17).

Nel corso degli anni, questo composto è stato studiato e ha guadagnato popolarità e interesse anche per le sue proprietà antineoplastiche, antivirali e antinfiammatorie (18, 19).

Esistono però numerosi dati di epatotossicità attribuibili a prodotti a base di erbe contenenti *L. tridentata* foglie (20). Negli anni '90 del secolo scorso, la Food and Drug Administration (FDA) statunitense ha registrato una serie di casi di epatotossicità correlata all'uso di "Chaparral", che andavano da lievi aumenti delle concentrazioni sieriche di enzimi epatici a epatiti fulminanti, che hanno richiesto un successivo trapianto di fegato per insufficienza epatica. La tossicità di "Chaparral" viene attribuita all'acido nordiidroguaiaretico (17, 21-23).

La fisiopatologia della tossicità del Chaparral è ancora sconosciuta. Attualmente vengono discusse diverse possibilità: il principio attivo del Chaparral, l'acido nordiidroguaiaretico, può inibire la trasformazione dell'acido arachidonico per interferenza con la ciclo-ossigenasi. Inoltre, è stata descritta l'inibizione del citocromo P450 (24, 19). Entrambi gli effetti inibitori possono essere responsabili dei danni agli epatociti. Inoltre, alcuni metaboliti del Chaparral rivelano attività estrogenica e gli stessi estrogeni possono essere epatotossici (25, 26).

L'acido nordiidroguaiaretico è un componente polifenolico contenuto come tale in ingenti quantità nelle piante del genere *Larrea* (9-15%). Chimicamente è un catecolo lignanico, a cui sono attribuite le lesioni linfatiche e renali che si osservano quando viene somministrato cronicamente ad alte dosi ai roditori (27). Altre documentazioni scientifiche suggeriscono, inoltre, che il consumo cronico di acido nordiidroguaiaretico può causare tossicità epatica negli esseri umani. L'acido nordiidroguaiaretico probabilmente subisce una biotrasformazione nella specie chimica più reattiva di chinone, che è responsabile della sua tossicità (16).

## Analisi del campione

Di fronte al campione denominato Chaparral (*Larrea tridentata*), costituito da un barattolo contenente "180 capsule da 500 mg", la cui vendita non è permessa in Italia come integratore alimentare, ma neanche come farmaco (3, 11), è parso giusto innanzitutto verificare se ciò che veniva dichiarato in etichetta corrispondesse al vero. Per procedere in questa direzione ci si è procurato da una ditta tedesca, fornitrice di piante certificate, le foglie della pianta *L. tridentata* Coult (*syn L. mexicana* Moric) utilizzata come standard analitico, per confrontarla con la specie botanica presente nel prodotto denominato Chaparral. Oltre alla pianta è stato acquistato, come marker identificativo, l'acido nordiidroguaiaretico il componente più abbondante e responsabile della maggior parte degli effetti biologici della *L. tridentata*, per ottenere insieme alla valutazione qualitativa anche una stima del suo contenuto nel campione da esaminare.

Le farmacopee di vari Paesi – Europa, Stati Uniti, Cina – e World Health Organization (WHO) nelle linee guida su "Quality control methods for herbal materials" per definire la qualità di prodotti a base di piante raccomandano la tecnica della cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography*, TLC) o quella ad alta prestazione (*High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC), e l'utilizzo del "fingerprint" per l'identificazione di una pianta o una miscela di piante, e la determinazione della presenza di eventuali impurezze nei preparati vegetali (28).

L'idoneità di un metodo analitico dipende dalla matrice del campione da analizzare e dagli obiettivi da raggiungere con l'analisi. Mentre la parte di pianta o la sua forma in polvere, che costituiscono le materie prime, possono essere identificate da caratteristiche macroscopiche o microscopiche, ciò non è possibile quando tale materiale viene estratto o lavorato. In questi casi, le tecniche cromatografiche, come la cromatografia su strato sottile ad alta prestazione (HPTLC) o la cromatografia liquida ad alta prestazione HPLC sono le più idonee per studiare la qualità del materiale vegetale, valutarne l'identità, la composizione e non per ultimo individuare la presenza

di adulteranti. La HPTLC è una metodica che permette flessibilità, sensibilità specifica, e una semplice preparazione del campione.

La HPTLC accoppiata alla densitometria, una tecnica ormai in uso dalla nostra unità operativa da parecchi anni, si è rivelata molto indicata per ottenere, in un tempo relativamente breve e analizzando più campioni in contemporanea, un *identikit* delle specie vegetali tramite il riconoscimento della loro impronta digitale ovvero del loro tracciato cromatografico (29-31).

Nel caso del Chaparral il primo passo è stato ricercare in letteratura se già fosse stato sviluppato un metodo analitico in HPTLC per la *Larrea*. La ricerca ha evidenziato metodi analitici per la parte di pianta utilizzata e per l'acido nordiidroguaiaretico. Tra i vari metodi è stato utilizzato, dopo la messa a punto e la riconvalida nel nostro laboratorio, quello della Camag, sviluppato in HPTLC per la ricerca del NDGA nell'estratto metanolico di campioni di foglie di Chaparral (32).

Le tracce cromatografiche, come profili definiti "fingerprints", ottenute per il campione Chaparral e il riferimento della pianta sono risultati simili in intensità e  $R_f$  (*Retention factor*) delle macchie separate sulla lastra e nei densitogrammi (Figura 1 e Figura 2). Si è perciò potuto affermare che nel campione sequestrato fosse presente la pianta *L. tridentata* come riportato in etichetta. Non risultavano, peraltro, dalla lastra ulteriori bande attribuibili ad altre eventuali sostanze aggiunte.

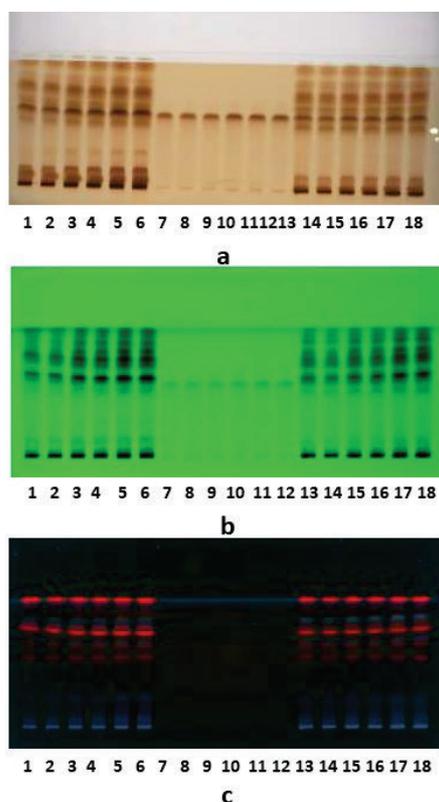
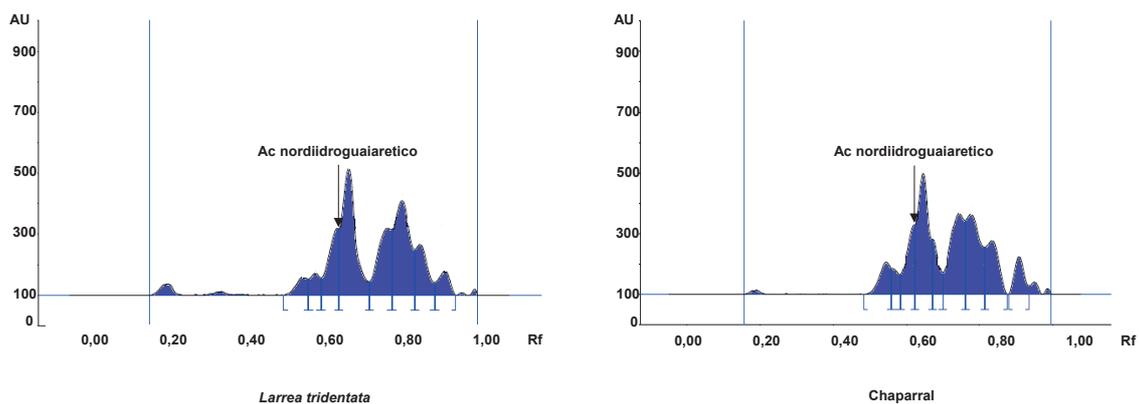


Figura 1. Lastra HPTLC 60 F 254 in gel di silice su vetro 20,0 x 10,0 cm eluita con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  70:9,2 letta al visualizer: a) dopo derivatizzazione con il reattivo Fast Blu salt B a luce bianca, b) a  $\lambda$  254 nm e c) a  $\lambda$  365 nm; tracce 1-6 *Larrea tridentata* deposizioni in doppio di 200, 300 e 400  $\mu\text{g}$ ; tracce 7-12 acido nordiidroguaiaretico std da 3, 4  $\mu\text{g}$  ciascuna concentrazione applicata in triplicato; tracce 13-18 campione Chaparral deposizioni in doppio di 200, 300 e 400  $\mu\text{g}$



**Figura 2. Densitogrammi a confronto tra la pianta *Larrea tridentata* di riferimento e il campione Chaparral**

Il caso esposto porta a ribadire la necessità di rivolgersi per l'acquisto di un integratore ai canali autorizzati e di consultare il medico o il farmacista prima dell'assunzione: ciò è particolarmente importante in considerazione del fatto che alcuni prodotti acquistati sul web possono essere non conformi ai criteri stabiliti dalla Direttiva 2002/46/CE per la loro produzione e commercializzazione (33).

Come il Chaparral, molti preparati presenti online provengono da stati esteri dove i controlli sulla sicurezza e qualità potrebbero essere carenti. È evidente come la figura di un professionista della salute fornisca la garanzia di un acquisto sicuro, e inoltre permetta al consumatore di avere le indicazioni necessarie di come e quanto assumere il preparato anche in concomitanza con altri farmaci (34).

## Caso “Curcuma”

Circa 27 casi di epatite colestatica acuta, tutti presumibilmente attribuiti a diversi nuovi integratori alimentari a base di curcuma e curcumina, sono stati segnalati nel giugno 2019 al sistema di Fitosorveglianza, VigiErbe.it ([www.vigierbe.it](http://www.vigierbe.it)), coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità. Dopo la segnalazione alcuni di questi prodotti sono stati ritirati dalle aziende.

Una prima lista di integratori fu redatta dal Ministero della Salute che invitò i consumatori “a sospendere temporaneamente a titolo precauzionale il consumo” delle confezioni acquistate sia nei canali tradizionali, sia online e affermò che erano in corso le verifiche per individuare la causa delle epatiti (35).

I preparati incriminati, responsabili dei casi di epatiti segnalati erano prodotti a base di estratti di curcuma diversi tra di loro, e avevano manifestato tali reazioni avverse dopo l'assunzione di dosi molto variabili di curcumina, principio attivo in essi contenuto, anche se nella maggior parte dei casi la dose assunta era anche più alta di quella raccomandata e spesso associato ad altri ingredienti volti ad aumentarne l'assorbimento.

Su questi prodotti, pervenuti all'Istituto Superiore di Sanità, sono state effettuate diverse analisi per escludere la presenza di contaminanti o di sostanze farmaceutiche volontariamente aggiunte, a cui si potevano ricondurre le cause del danno epatico (36).

In base a ricerche bibliografiche e a informazioni fornite dagli altri Stati membri, però, emersero altre segnalazioni di casi di epatiti acute a impronta colestatica correlati all'uso di estratti di curcuma.

Per questa ragione una commissione di esperti facenti capo al Ministero della Salute ha stabilito di inserire una specifica avvertenza nell'etichetta degli integratori a base di curcuma come quelli in questione, volta a sconsigliarne l'uso a soggetti con alterazioni della funzione epato-biliare o con calcolosi delle vie biliari e, in caso di concomitante assunzione di farmaci, a sentire sempre il parere del medico.

Per la curcuma venduta come spezia (polvere del rizoma della pianta) e come colorante alimentare (E100 nella codifica europea degli additivi alimentari), dato il consumo ridotto, non sono emersi elementi per particolari raccomandazioni. Tuttavia la situazione continua a essere seguita con attenzione in relazione all'emergere di possibili nuovi elementi o dati scientifici da considerare al fine di tutelare la sicurezza dei consumatori (35).

I prodotti sequestrati a base di curcuma pervennero al Dipartimento di sicurezza Alimentare Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria (SANV) dell'Istituto Superiore di Sanità affinché fossero effettuate le dovute analisi di controllo in riferimento alla composizione dei preparati, al fine di verificare se la causa scatenante dei casi di epatite fosse ascrivibile alla loro composizione e, in collaborazione con il Centro Nazionale Ricerca e Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci, fu formulata una risposta.

Esaminando, per prima cosa, le etichette dei prodotti implicati di diverse ditte produttrici, si constatò che presentavano una composizione quali-quantitativa differente. Alcuni dichiaravano contenere curcuma, altri curcumina, altri curcuma addizionata di piperina che, come noto, migliora l'assorbimento della curcumina altrimenti poco solubile e poco biodisponibile. Data la variabilità delle diciture nella composizione, importante era verificare se tali prodotti contenessero effettivamente curcuma nella specie *Curcuma longa*, autorizzata a essere immessa negli integratori alimentari (Allegato 1 DM 10 agosto 2018. *Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali*).

La *Curcuma longa* L. (curcuma) è una pianta della stessa famiglia dello zenzero (*Zingiberaceae*) e appartiene al gruppo delle più antiche piante aromatiche coltivate nei Paesi del sud-est asiatico (37). Per molti anni il rizoma di questa pianta, che rappresenta la parte sotterranea del fusto, è stato utilizzato per trattare: disturbi biliari, ittero, anoressia, tosse, ulcere diabetiche, disturbi epatici, reumatismi, infiammazione, sinusite, disturbi mestruali, ematuria, ed emorragia.

La curcuma o curcumin è anche usata come antisettico, analgesico, antinfiammatorio, antimalarico, repellente per insetti (38) e nella cura del diabete mellito (37).

Il principio attivo della curcuma è un diferuloilmetano, la curcumina, a cui possono essere attribuite le molteplici proprietà terapeutiche. Negli ultimi anni, sono state effettuate molte ricerche, oggetto di numerose pubblicazioni, correlate da test *in vitro* e *in vivo* e da studi clinici, che hanno rivelato che le attività biologiche si manifestano soprattutto come proprietà antinfiammatorie, antiossidanti e come prevenzione nel cancro (39, 40).

La curcumina è un polifenolo lipofilo, quasi insolubile in acqua, ma abbastanza stabile nel pH acido dello stomaco.

A causa della sua rapida coniugazione e *clearance* plasmatica, e quindi alla sua rapida eliminazione, la sua utilità terapeutica è stata alquanto limitata, portando i ricercatori a indagare sull'opportunità di complessare la curcumina con altre sostanze per aumentarne la biodisponibilità sistemica.

Una sostanza che è stata studiata per ovviare a questa difficoltà è l'alcaloide piperina, un costituente del pepe nero e del pepe lungo (*Piper nigrum* e *Piper longum*, rispettivamente).

Nell'uomo somministrando 20 mg di piperina in associazione a 2 g di curcumina si determina un aumento della biodisponibilità sierica pari a 20 volte quella della curcumina da sola, capacità che è stata attribuita all'inibizione da parte della piperina della glucuronidazione epatica e del metabolismo intestinale (41).

Un altro metodo attualmente in fase di studio, sempre volto a eliminare il problema della insolubilità in acqua della curcumina, complessa quest'ultima con un fosfolipide, noto come fitosoma capace di creare un sistema di trasporto innovativo per principi attivi poco biodisponibili.

Il complesso fosfatidilcolina-curcumina è più facilmente assorbito nelle membrane cellulari lipofile, rendendolo in modo significativo più biodisponibile della curcumina non legata. In esperimenti fatti da alcuni ricercatori sui ratti, la concentrazione plasmatica massima e la durata dell'azione in base all'*Area Under the time/Concentration Curve* (AUC), di questo complesso risultavano cinque volte maggiori rispetto alla curcumina non legata (41).

La ricerca mostra che la curcumina è una molecola altamente pleiotropica in grado di interagire con numerose molecole bersaglio coinvolte nell'infiammazione. Il meccanismo d'azione con cui la curcumina modula la risposta infiammatoria sembra sia quello della sottoregolazione (*down-regulation*) delle attività della cicloossigenasi-2 (COX-2), delle lipossigenasi, degli enzimi inducibili di ossido nitrico sintetasi (iNOS) e dell'inibizione della produzione delle citochine infiammatorie (41).

Attualmente, è stata dedicata grande attenzione alla curcumina come bloccante del Fattore della Necrosi Tumorale (*Tumour Necrosis Factor*, TNF-s) citochina che entra in gioco durante i processi infiammatori del nostro organismo, mediatore della maggior parte dei disturbi legati all'infiammazione (42).

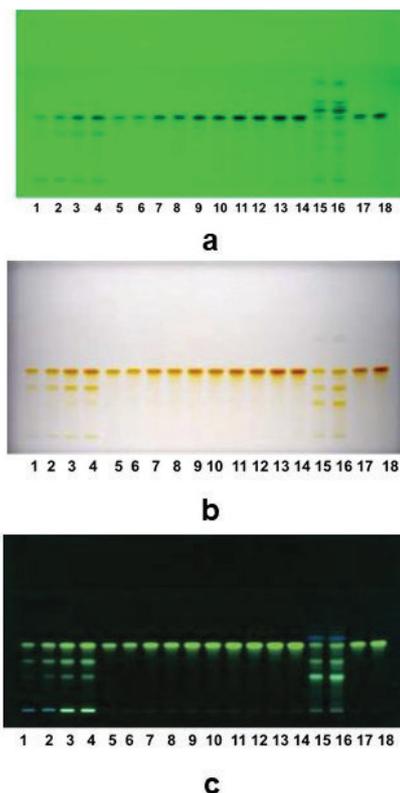
La causa principale del blocco delle indagini farmacologiche e cliniche sulla curcumina è dovuta alla sua solubilità estremamente bassa in acqua e nei fluidi organici (37). I principi attivi più abbondanti della curcumina rizoma polvere sono i curcuminoidi, con il costituente principale, la curcumina (77%) e i suoi derivati naturali: demetossicurcumina (DMC) (17%) e bisdemetossicurcumina (BDMC) (6%) (37).

## Farmacopea e saggio di identificazione

La *Curcuma longa* L. (*syn. Curcuma domestica* Valetton) rizoma è presente come monografia nella Farmacopea Europea nona edizione (43) e come saggio di identificazione al paragrafo C) prevede il metodo di cromatografia su strato sottile (TLC; 2.2.27).

Tale saggio di identificazione viene effettuato per evidenziare l'eventuale presenza di altre specie di curcumina come per esempio la *C. zanthorrhiza* che in TLC non presenterebbe a differenza della *C. longa* alcuna zona marrone appena al di sotto della zona corrispondente al timolo, utilizzato come soluzione di riferimento (43).

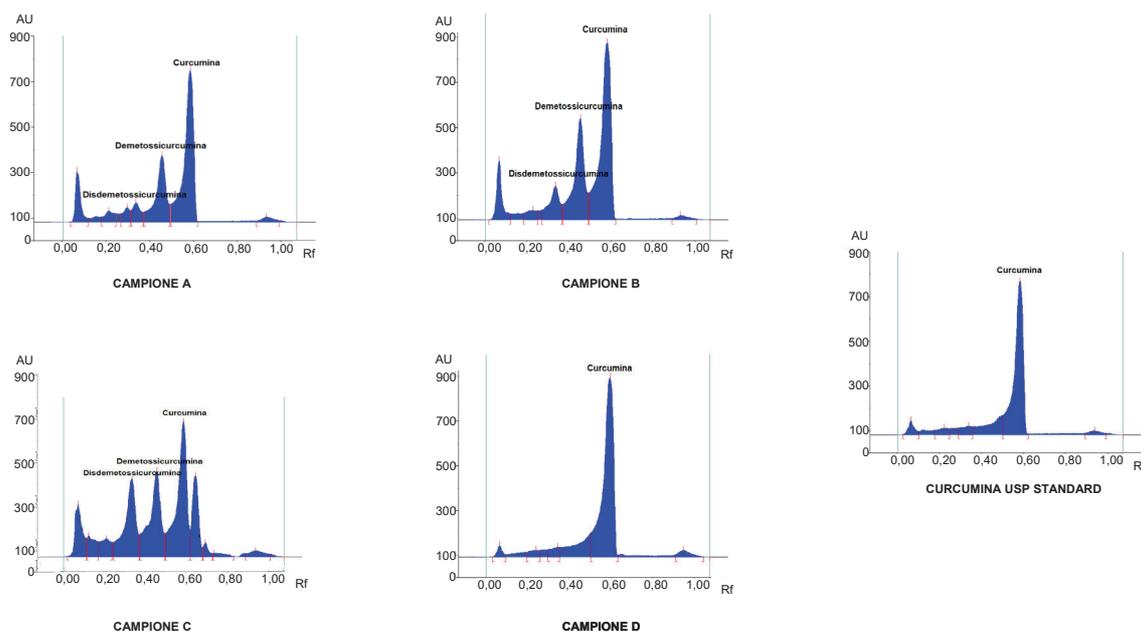
Con la tecnica della HPTLC densitometrica, utilizzata nel nostro laboratorio, le singole macchie presenti sulla lastra e corrispondenti ai componenti separati dall'estratto vengono trasformate in tracciati cromatografici, definiti densitogrammi capaci di mostrare curve analogiche simili ai picchi della più comune tecnica dell'HPLC. Nell'HPTLC, la porosità più fine della silice, posta su una lastra in vetro, rende questa tecnica più sensibile rispetto alla TLC e tale da permettere di identificare e quantificare quantità molto piccole dei campioni di CURCUMA A, B, C e D da esaminare nell'ordine dell'intervallo di nanogrammi (Figura 3).



**Figura 3. Lastra HPTLC 60 F 254 in gel di silice su vetro 20,0 x 10,0 cm: a) letta al visualizer a 254 nm, b) letta al visualizer alla luce bianca e c) letta al visualizer a 365 nm; tracce 1, 2 estratto contenente CURCUMA campione A, 25 µg e 37,5 µg rispettivamente; tracce 3, 4 estratto contenente CURCUMA campione B, 12,5 µg e 15 µg rispettivamente; tracce 5-14 Curcumina std USP da 1 µg a 3 µg, in doppio, con incremento di 0,5 µg; tracce 15, 16 estratto contenente CURCUMA e PIPERINA campione C, 40 µg e 60 µg rispettivamente; tracce 17, 18 estratto contenente CURCUMA campione D, 3 µg e 4 µg rispettivamente**

Dai densitogrammi riportati in Figura 4, dei campioni incriminati e analizzati secondo il metodo TLC descritto per la curcumina nella monografia relativa di Farmacopea Europea, si evince che:

- è stata utilizzata per alcuni campioni veramente la pianta *Curcuma longa* L., perché per questi sono presenti i picchi dei tre principali costituenti di questa specie, i tre curcuminoidi curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina.
- si è potuto escludere la presenza delle altre due specie riportate in letteratura come adulteranti, in quanto se fosse stata utilizzata *Curcuma zanthorrhiza* Roxb. in luogo di *C. longa* non sarebbe stata presente la bisdemetossicurcumina, mentre sarebbe stata rivelata con il reattivo anisaldeide una banda in più nel terzo superiore della corsa cromatografica tipica della *C. zanthorrhiza* (monografia n. 01/2015: 1441 di Farmacopea Europea); se invece fosse stata utilizzata la *Curcuma zedoaria* Rosc. la demetossicurcumina corrispondente alla banda a  $R_f$  centrale sarebbe stato il curcuminoide prevalente sugli altri due (*Botanical Adulterants Bulletin*, May 2018).
- si evidenzia per altri campioni la presenza della sola curcumina, essendo il densitogramma costituito da un solo picco a  $R_f$  corrispondente allo *standard* di riferimento utilizzato, la curcumina *standard* USP della *United States Pharmacopeia*, chimicamente il (E,E)-1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione).



**Figura 4. Densitogrammi dei campioni A), B), C) e D) a confronto con la curcumina USP standard di riferimento letti al densitometro a 365 nm**

Dalla nostra analisi non è stato possibile capire se la curcumina fosse di origine naturale o di sintesi. È noto che gli organismi vivi o vissuti recentemente fanno parte del ciclo del carbonio, e contengono una quantità nota di carbonio-14. Questo radioisotopo decade col tempo: il petrolio e i suoi derivati sono infatti di origine così antica che il carbonio-14 è completamente assente. Misurando quindi il carbonio-14 si ha un'indicazione precisa del contenuto naturale di una sostanza organica naturale come la curcumina (44). Così su quei campioni che non mostravano nei cromatogrammi i 3 picchi dei curcuminoidi presenti nella pianta fu eseguita, da altri laboratori, l'analisi del C14 mediante spettrometria di massa. Questa tecnica ha chiarito definitivamente che la curcumina nei campioni in esame fosse di origine naturale e non di sintesi in quanto, nella curcumina di origine naturale, il C14 è più abbondante.

Il Ministero della Salute, in base ai risultati delle analisi interdisciplinari condotte, ha quindi escluso la presenza di contaminanti nei prodotti analizzati a base di curcumina che potevano aver provocato quei casi di epatite denunciati. Nella nota pubblicata il 26 luglio 2019 sul sito del Ministero della Salute si afferma che “le cause erano verosimilmente da ricondurre a particolari condizioni di suscettibilità individuale, di alterazioni preesistenti, anche latenti, della funzione epato-biliare o anche alla concomitante assunzione di farmaci” (45). Nella stessa nota veniva comunicata l'intenzione del Ministero di adottare una specifica avvertenza per l'etichettatura degli integratori contenenti estratti e preparati di *Curcuma longa*, poi riportata nella colonna “Prescrizione etichetta” dell'Allegato 1 al DM 10 agosto 2018 sulla “Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di Sostanze e preparati vegetali”, nell'ultimo aggiornamento del Decreto 26 luglio 2019: “In caso di alterazioni della funzione epatica, biliare o di calcolosi delle vie biliari, l'uso del prodotto è sconsigliato. Se si stanno assumendo farmaci, è opportuno sentire il parere del medico.” (3). Nello stesso Allegato 1 aggiornato al luglio 2019 nella colonna sulle “Linee guida ministeriali di riferimento per gli effetti fisiologici” vengono tolti tutti i riferimenti a “funzione epatica”, “funzione digestiva” e “funzionalità del sistema digerente” (46).

## Conclusioni

A causa della complessità di una pianta o un suo derivato, per caratterizzare le diverse classi di metaboliti in essa presenti, una singola tecnica analitica è generalmente insufficiente. In uno studio di metabolomica la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare e la spettrometria di massa sono le più frequentemente utilizzate pur presentando, ognuna in modo diverso, dei limiti nel rilevare tutte le classi chimiche. Tra i sistemi introdotti di recente, la cromatografia su strato sottile ad alta prestazione unita alla densitometria (HPTLC densitometrica) ha mostrato un potenziale interessante come strumento complementare e più completo per uno studio di metabolomica e ci ha permesso di individuare velocemente, nel caso del Chaparral, la corrispondenza del prodotto alla pianta certificata, per la curcuma le differenze nella composizione tra i prodotti presenti in commercio.

## Bibliografia

1. Italia. Decreto Legislativo 24 aprile 2006, n.219. Attuazione della direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa a un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE. *Gazzetta Ufficiale* n. 142 del 21-6-2006 - Suppl. Ordinario n.153.
2. Italia. Decreto Legislativo 21 maggio 2004, n. 169. Attuazione della direttiva 2002/46/CE relativa agli integratori alimentari. *Gazzetta Ufficiale* n. 164 del 15 luglio 2004.
3. Ministero della Salute. DM 10 agosto 2018. Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali, Allegato 1, come aggiornato con Decreto 9 gennaio 2019 e Decreto 26 luglio 2019. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* 224 del 26/9/2018.
4. FederSalus. *Le farmacie e parafarmacie online trainano il mercato degli integratori alimentari*. Roma: Federsalus; 2021. Disponibile all'indirizzo: <https://www.federsalus.it/le-farmacie-e-parafarmacie-online-trainano-il-mercato-degli-integratori-alimentari/>; ultima consultazione 24/02/2021.
5. Ministero della Salute. *Etichettatura e Claims*. Roma: Ministero della Salute; 2016. Disponibile all'indirizzo: [http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_5.jsp?area=nutrizione&menu=etichettatura](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_5.jsp?area=nutrizione&menu=etichettatura); ultima consultazione 24/02/2021.
6. Ministero della Salute. *Vendita on line di medicinali*. Roma: Ministero della Salute; 2016. Disponibile all'indirizzo: [http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_5.jsp?lingua=italiano&area=farmaci&menu=online](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_5.jsp?lingua=italiano&area=farmaci&menu=online); ultima consultazione 24/02/2021.
7. Europa. Direttiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 giugno 2002 per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 183 del 12/7/2002.
8. European Commission. *RASFF-Food and Feed safety alerts*. RASFF portal. Bruxelles: European Commission; 2020. Disponibile all'indirizzo: [https://ec.europa.eu/food/safety/rasff/portal\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/rasff/portal_en); ultima consultazione 24/02/2021.
9. Ministero della Salute. *RASFF - Sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi*. Roma: Ministero della Salute; 2020. Dati disponibili all'indirizzo: [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2914\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2914_allegato.pdf); ultima consultazione 24/02/2021.
10. Istituto Superiore di Sanità, ISS-Epicentro. *Fitosorveglianza*. Roma: ISS-Epicentro; 2021. Disponibile all'indirizzo: <https://www.epicentro.iss.it/fitosorveglianza/>; ultima consultazione 24/02/2021.

11. Ministero della Salute. *Registro degli integratori alimentari*. Roma: Ministero della Salute; 2020. [http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=3668&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=registri](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3668&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=registri); ultima consultazione 24/02/2021.
12. Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cárdenas R. *Larrea tridentata* (Creosote bush) an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol* 2005;26;98(3):231-9.
13. Gnabre J, Bates R, Huang RC. Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *J Tradit Complement Med* 2015; 5(3):119-126.
14. Zuravnsky KN. *Understanding the roles of polyploidy and the environment on nordihydroguaiaretic variation in Larrea tridentata*. [Unpublished master's thesis]. Salisbury, MD: Salisbury University; 2014.
15. Mabry TJ, Hunziker JH, DiFeo DR (Ed.). *Creosote bush: biology and chemistry of Larrea in New World deserts*. Dowden: Hutchinson & Ross, Inc.; 1978.
16. Billinsky JL, Marcoux MR, Krol ES. Oxidation of the lignan nordihydroguaiaretic acid. *Chem Res Toxicol* 2007;20(9):1352-8.
17. Lambert JD, Zhao D, Meyers RO, Kuester RK, Timmermann BN, Dorr RT. Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 2002;40(12):1701-8.
18. Manda G, Rojo AI, Martínez-Klimova E, Pedraza-Chaverri J, Cuadrado A. Nordihydroguaiaretic Acid: From herbal medicine to clinical development for cancer and chronic diseases. *Front Pharmacol* 2020;11:151.
19. Agarwal Rajesh, Wang Zy, Bik DP, Mukhtar Hasan. Nordihydroguaiaretic acid an inhibitor of lipoxygenase also inhibits cytochrome P-450-mediated monooxygenase activity in rat epidermal and hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 1991;19(3):620-4.
20. Stickel F, Egerer G, Seitz HK. Hepatotoxicity of botanicals. *Public Health Nutr* 2000;3(2):113-24.
21. Navarro VJ, Seeff LB. Liver injury induced by herbal complementary and alternative medicine. *Clin Liver Dis* 2013;17(4):715-35.
22. Seeff L, Stickel F, Navarro VJ. Hepatotoxicity of herbs and dietary supplements. In: Kaplowitz N, DeLeve LD (Ed.). *Drug-induced liver disease*, 3rd edn. Amsterdam: Elsevier; 2013. p. 631-58.
23. Estes JD, Stolpman D, Olyaei A, *et al*. High prevalence of potentially hepatotoxic herbal supplement use in patients with fulminant hepatic failure. *Arch Surg* 2003;138(8):852-8.
24. Capdevila J, Gil L, Orellana M, Marnett LJ, Mason JI, Yadagiri P, Falck JR. Inhibitors of cytochrome P-450-dependent arachidonic acid metabolism. *Arch Biochem Biophys* 1988;261(2):257-63.
25. Obermeyer WR, Musser SM, Betz JM, Casey RE, Pohland AE, Page SW. Chemical studies of phytoestrogens and related compounds in dietary supplements: flax and chaparral. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208(1):6-12.
26. Sheikh NM, Philen RM, Love LA. Chaparral-associated hepatotoxicity. *Arch Inter Med* 1997;157(8):913-9.
27. Kang I, Park M, Yang SJ, Lee M. Lipoprotein lipase inhibitor nordihydroguaiaretic acid aggravates metabolic phenotypes and alters HDL particle size in the western diet-fed db/db mice. *Int J Mol Sci* 2019;20(12):3057.
28. World Health Organization. *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. Geneva: World Health Organization; 1998.
29. Nicoletti M., Toniolo C, Gallo FR, Multari G, Palazzino G. Traceability in multi-ingredient botanicals by HPTLC fingerprint approach. *JPC* 2013; 26(3):243-7.

30. Gallo FR, Multari G, Panusa A, Pagliuca G, Palazzino G, Giambenedetti M, Petitto V, Nicoletti M. Bearberry identification by a multidisciplinary study on commercial raw materials. *Nat Prod Res* 2013;27(8):735-42.
31. Gallo FR, Multari G, Federici E, Palazzino G, Giambenedetti M, Petitto V, Nicoletti M. Chemical fingerprinting of *Equisetum arvense* L. using HPTLC Densitometry and RP-LC. *Nat Prod Res* 2011;(13):1261-70.
32. HPTLC Association. *Chaparral Leaf (Larrea tridentata)*. 2017. Disponibile all'indirizzo: [https://www.hptlc-association.org/media/3K5E87I2/Larrea\\_tridentata\\_Chaparral\\_leaf\\_HPTLC\\_Association\\_31\\_Aug\\_2017.pdf](https://www.hptlc-association.org/media/3K5E87I2/Larrea_tridentata_Chaparral_leaf_HPTLC_Association_31_Aug_2017.pdf); ultima consultazione 21/02/2022.
33. Unione Italiana Food. *Linea guida sulla qualità degli integratori alimentari*. 33. Milano: Unione Italiana Food; 2019. Disponibile all'indirizzo: <http://www.integratoriitalia.it/wp-content/uploads/2019/02/Linee-Guida-Qualita%CC%80-Integratori-febbraio-2019.pdf>; ultima consultazione 24/02/2021.
34. Ministero della Salute. *Decalogo per un corretto uso degli integratori alimentari*. Roma: Ministero della Salute; 2019. [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_opuscoliPoster\\_191\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_opuscoliPoster_191_allegato.pdf); ultima consultazione 01/02/2021.
35. Ministero della Salute. *Integratori alimentari contenenti estratti e preparati di Curcuma longa*. Roma: Ministero della Salute; 2021. Disponibile all'indirizzo: [http://www.salute.gov.it/portale/news/p3\\_2\\_1\\_1\\_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministro&id=3842](http://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministro&id=3842); ultima consultazione 24/02/2021.
36. Menniti-Ippolito F, Ippoliti I, Pastorelli AA, Altieri I, Scalise F, De Santis B, Debegnach F, Brera C, Pacifici R, Pichini S, Pellegrini M, Rotolo MC, Graziano S, Palazzino G, Multari G, Gallo FR, Neri B, Giannetti L, Russo K, Fedrizzi G, Bonan S, Mazzanti G, Moro PA, Salvi E, Firenzuoli F, Valeri A, Moretti U, Traversa G, Silano M, Stacchini P, Boniglia C. Turmeric (*Curcuma longa* L.) food supplements and hepatotoxicity: an integrated evaluation approach. *Ann Ist Super Sanità* 2020;56(4):462-9.
37. Karłowicz-Bodalska K, Han S, Freier J, Smolenski M, Bodalska A. Curcuma longa as medicinal herb in the treatment of diabetic complications. *Acta Pol Pharm* 2017;74(2):605-10.
38. Damalas CA. Potential uses of turmeric (*Curcuma longa*) products as alternative means of pest management in crop production. *Plant Omics* 2011;4(3):136-41.
39. Mahmood K, Zia KM, Zuber M, Salman M, Anjum MN. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: a review *Int J Biol Macromol* 2015;81:877-90.
40. Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, Tan BKH, Kumar AP, Sethi G. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules* 2015;20:2728-69.
41. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* 2009;14 (2):141-53.
42. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br J Pharmacol* 2013;169:1672-79.
43. Council of Europe. *Curcumae zanthorrhizae rhizoma Monographs 1441 e Curcumae longae rhizoma 2543*. In: *European Pharmacopoeia. 9th Edition*. Strasbourg: Council of Europe; 2020. p. 1545.
44. Beta Analytic Testing Laboratory. *Analisi al carbonio-14 della curcumina*. Miami, FL: Beta Analytic; 2021. Disponibile all'indirizzo: <https://www.betalabservices.com/italiano/prodotti-naturali/curcumina-analisi.html>; ultima consultazione 24/02/2021.
45. FederSalus. *Integratori alimentari a base di curcuma ed epatite: il Ministero della Salute esclude una relazione di causa-effetto*. Roma: FederSalus. Disponibile all'indirizzo:

<https://www.federsalus.it/integratori-alimentari-a-base-di-curcuma-ed-epatite-il-ministero-della-salute-esclude-una-relazione-di-causa-effetto/>; ultima consultazione 24/02/2021.

46. Farmacovigilanza.eu. *Epatiti acute colestatiche associate a prodotti a base di curcuma*. Verona: Farmavigilanza.eu; 2019; Disponibile all'indirizzo: <https://www.farmacovigilanza.eu/content/epatiti-acute-colestatiche-associate-prodotti-base-di-curcuma>; ultima consultazione 24/02/2021.
47. Council of Europe. *Homeostasis, a model to distinguish between food, including food supplements, and medicinal products*. Strasbourg: Council of Europe; 2008. p. 8.