

# PipeNig®

*Un estratto di pepe nero (*Piper nigrum*) con un elevato contenuto standardizzato dell'endo-cannabinoide (E)-β-cariofillene*

Il sistema cannabinoide endogeno (ECS) svolge un ruolo importante nella risposta immunitaria a un'infezione. Il recettore cannabinoide CB2 ha una distribuzione sia periferica, a causa della sua espressione sulle cellule immunitarie circolanti, che centrale, essendo espresso nel cervello, nel cervelletto e nelle cellule microgliali. Il recettore CB2 è coinvolto nell'attenuazione delle risposte immunitarie infiammatorie e i ligandi del recettore CB2 inibiscono l'infiammazione e la formazione di edemi, mostrano effetti analgesici, svolgono un ruolo protettivo nel danno epatico da ischemia da riperfusione e prevengono la colite riducendo l'infiammazione e attivano l'immunosoppressione (1). Gli agonisti selettivi del recettore CB2 sono privi degli effetti collaterali psicoattivi tipicamente associati all'attivazione del recettore CB1 (recettore del THC) e pertanto sono potenziali candidati come valido supporto per una serie di diverse patologie e come sostituti di terapie a base di cannabis. L'idrocarburo sesquiterpenico (E)-β-cariofillene (BCP (Fig.1) è un composto naturale presente in diverse specie vegetali come nell'olio di *Syzygium aromaticum*, nell'olio essenziale di *Cannabis sativa* e *Rosmarinus officinalis*, nell'*Humulus lupulus* e nel *Piper nigrum*. Il BCP, legandosi selettivamente al recettore CB2, è un agonista funzionale del CB2 (2). Il BCP esercita effetti ansiolitici e antidepressivi. La possibilità che il BCP possa migliorare i disturbi dell'umore offre anche interessanti prospettive per studi futuri (3). Infine, BCP possiede proprietà antiossidanti, prevenendo il danno ossidativo lipidico e migliorando l'attività della glutatione perossidasi, un importante enzima legato alla prevenzione dell'aterosclerosi.

## Composizione e Specifiche tecniche

PipeNig® è il marchio registrato di un estratto innovativo di pepe nero (*Piper nigrum*) prodotto da Biosfered (Torino, Italia) caratterizzato dal più alto contenuto di BCP bioattivo disponibile sul mercato. Per garan-

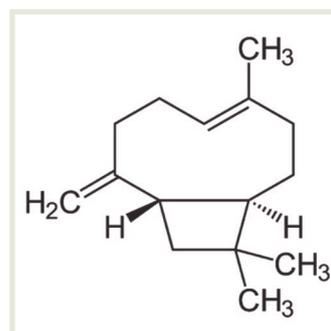


Figura 1 - Formula di struttura dell'(E)-β-cariofillene

tire un elevato grado di standardizzazione, la caratterizzazione chimica del BCP viene effettuata da Biosfered tramite gascromatografia abbinata a spettrometria di massa (GC-MS), mentre la precisa quantificazione è effettuata tramite gascromatografia ab-

binata a detector a ionizzazione di fiamma (GC-FID). PipeNig® è disponibile sia in forma liquida (PipeNig®-FL, con un contenuto standardizzato di BCP di 800 g/kg) che in polvere (PipeNig®-PWD, con un contenuto standardizzato di BCP di 300 g/kg). Nella forma liquida viene utilizzato olio di riso come eccipiente, mentre nella forma solida il BCP è adsorbito su amido di riso tramite un processo brevettato da Biosfered. Le specifiche tecniche di PipeNig®-FL e PipeNig®-PWD sono riportate in Tabella 1.

## Efficacia e Meccanismo d'azione

Un numero consistente di studi *in vitro* e *in vivo* sul BCP indica che i suoi effetti biologici includono attività antinfiammatorie, antimicrobiche, antiossidanti e analgesiche. Questi effetti biologici derivano dalla capacità di BCP di attivare il recettore CB2. La specificità di BCP per il recettore CB2 implica che la sua azione sia priva degli effetti psicoattivi noti associati all'attivazione di CB1 e suggerisce il suo potenziale utilizzo. Pertanto, BCP offre la possibilità di ottenere un'azione antidolorifica e/o antinfiammatoria in alternativa all'uso della cannabis. L'efficacia analgesica del BCP sia per il dolore cronico sia per quello acuto è stata valutata *in vivo* sia rispetto al placebo sia rispetto alla morfina (4). I risultati hanno mostrato un'azione analgesica dose-dipendente sui topi con dosaggi rispettivamente di 5 mg/kg e 10 mg/

	PipeNig®-PWD	PipeNig®-FL
<b>Caratteristiche Organolettiche</b>		
Aspetto	Polvere (≥60 mesh)	Liquido
Colore	Giallo chiaro	Incolore
<b>Caratteristiche Fisico-Chimiche</b>		
Solvente di estrazione	Acqua	Acqua
Rapporto di estrazione	2,3:1	2,4:1
Contenuto in (E)-β-cariofillene (g/kg)	≥300	≥800
Contenuto in altri terpeni (g/kg)	≥25	≥65
Perdita in peso (%)	<9	<1
Densità (tapped bulk density) (kg/m <sup>3</sup> )	525-545	Non applicabile
<b>Contaminanti</b>		
Residuo solventi		
Etanolo (%)	≤0,05	<0,05
Metanolo (ppm)	<10	<10
Metalli pesanti (ppm)		
Pb	<3	<3
Cd	<1	<1
Hg	<0,1	<0,1
As	<1	<1
Aflatossine (B1, B2, G1, G2) (ppb)	<10	<10
Aflatossina B1 (ppb)	<5	<5
Ocratossina A (Reg. 1881/2006) (ppb)	<15	<15
Melamina (Reg. 1881/2006) (ppm)	<2,5	<2,5
Residuo di pesticidi	In accordo con Reg. (EC) N° 396/2005 e successive modifiche	
Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) (Reg.1933/2015)		
Benzo[a]pirene (ppb)	<10	<10
Somma di tutti gli IPA (ppb)	<50	<50
Eccipienti		
Riso ( <i>Oryza sativa</i> L.) (%)	Amido di riso <70	Olio di riso <20
Glutine (ppm)	≤20	≤20
<b>Caratteristiche Microbiologiche</b>		
Conta totale batteri aerobici vivi (ufc/g)	<5x10 <sup>4</sup>	<5x10 <sup>4</sup>
Totale conta combinata lievito/muffa (ufc/g)	<100	<100
<i>Salmonella</i>	Assente	Assente
<i>Enterobacteriaceae</i>	Assente	Assente
<i>Escherichia coli</i>	Assente	Assente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Assente	Assente
<b>Conservazione</b>	In contenitore sigillato al riparo dalla luce, umidità e calore	
<b>Stabilità</b>	24 mesi	
<b>Allergeni</b>	Assenti	
<b>Altre specifiche</b>	Prodotto non GMO, non contiene nanomateriali, prodotto non irradiato, prodotto adatto ai vegani, il BCP non è presente nell'elenco WADA.	

**Tabella 1** - Specifiche tecniche di PipeNig®-FL e PipeNig®-PWD.

kg per dolore acuto e cronico. Attraverso il confronto con la morfina e l'uso di cannabinoidi e antagonisti degli oppioidi (naloxone), l'azione antidolorifica del BCP potrebbe svolgersi non solo attraverso l'azione sui recettori dei cannabinoidi, ma anche sui recettori oppioidi. Pertanto l'uso congiunto di PipeNig® ad elevato contenuto di BCP ed estratti di mirra standardizzati in furanodieni (come MyrLiq® prodotto da Biosfered) che agiscono sui recettori oppioidi, offre la possibilità della completa copertura delle interazioni coi i recettori sia cannabinoidi (CB2) che oppioidi.

BCP si lega selettivamente al sito di legame CP55.940 di CB2 (sito di legame del THC), portando all'attivazione cellulare e agli effetti antinfiammatori. BCP si lega alla regione idrofobica del recettore. Questo legame porta all'inibizione della adenilato ciclas e quindi all'inibizione della conversione dell'ATP in AMP ciclico (cAMP). BCP induce debolmente la fosforilazione di p38 ed Erk1/2 nei monociti primari CD14+ e, allo stesso tempo, inibisce l'espressione delle proteine TNF-α e IL-1β stimolata da LPS nel sangue intero. Poiché le vie di segnalazione Erk1/2 e JNK1/2 sono fondamentali per l'espressione di IL-1β e TNF-α, il ligando del recettore CB2 BCP inibisce l'attivazione di queste chinasi e down-regola l'espressione di IL-1β e TNF-α (2,5). Recenti studi hanno evidenziato un ruolo del BCP nella modulazione del metabolismo e della massa corporea (6), e recenti ricerche hanno proposto un effetto ipolipidemico e antidiabetico (7) del BCP, orientando l'interesse della comunità scientifica verso un suo potenziale utilizzo terapeutico. Recenti scoperte hanno mostrato implicazioni significative per la ricerca clinica e sostengono fortemente l'efficacia del BCP come una molecola innovativa da indirizzare nello sviluppo di agenti terapeutici efficaci per la sclerosi multipla (8).

### Studi clinici

In uno studio pilota condotto dalla Farmacia Centrale (Cambiano, Italia), un campione equilibrato di 31 volontari (19 femmine e 12 maschi, di età compresa tra 36 e oltre 76 anni) che presentavano patologie di dolore acuto (48%) o cronico (52%) tra cui mal di testa (8%), dolore cervicale (20%), dolore alle articolazioni (32%), dolori muscolari (16%), dolore lombare (12%) e altro dolore (12%), è stato studiato per due mesi e confrontato con diversi FANS. I volontari hanno ricevuto 2 capsule al giorno contenenti 100 mg di PipeNig® (corrispondenti a 30 mg di BCP bioattivo per capsula) per 10 giorni o 2 capsule al giorno fino al sollievo dal dolore. Per tutti i volontari è stato registrato un punteggio basato su un questionario che riportava la propria esperienza diretta con PipeNig®. In generale, i volontari hanno riportato

una riduzione del dolore del 60% tra il 3° e il 4° giorno dalla somministrazione (**Fig.2A**) e l'effetto percepito era simile o leggermente inferiore al FANS utilizzato rispettivamente per il 38% e il 31% dei volontari (**Fig.2B**). Infine, quando ai volontari è stato chiesto se avrebbero in futuro usato regolarmente PipeNig®, oltre il 70% ha risposto affermativamente (**Fig.2C**). È in corso uno studio sul tessuto adiposo utilizzando le cellule 3T3-L1, una linea di preadipociti molto ben caratterizzata, e su epatociti umani HepG2 per individuare un nuovo approccio preventivo per l'obesità ed il diabete. Verrà perciò testata l'attività antiadipogenica e ipoglicemizzante dell'estratto PipeNig® sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare sono in corso studi sulle attività biologiche del PipeNig® quali: inibizione dell'adipogenesi, aumento della captazione di glucosio in condizioni di insulino-resistenza, e analisi delle vie di segnalazione intracellulari coinvolte in questi effetti.

## Sicurezza

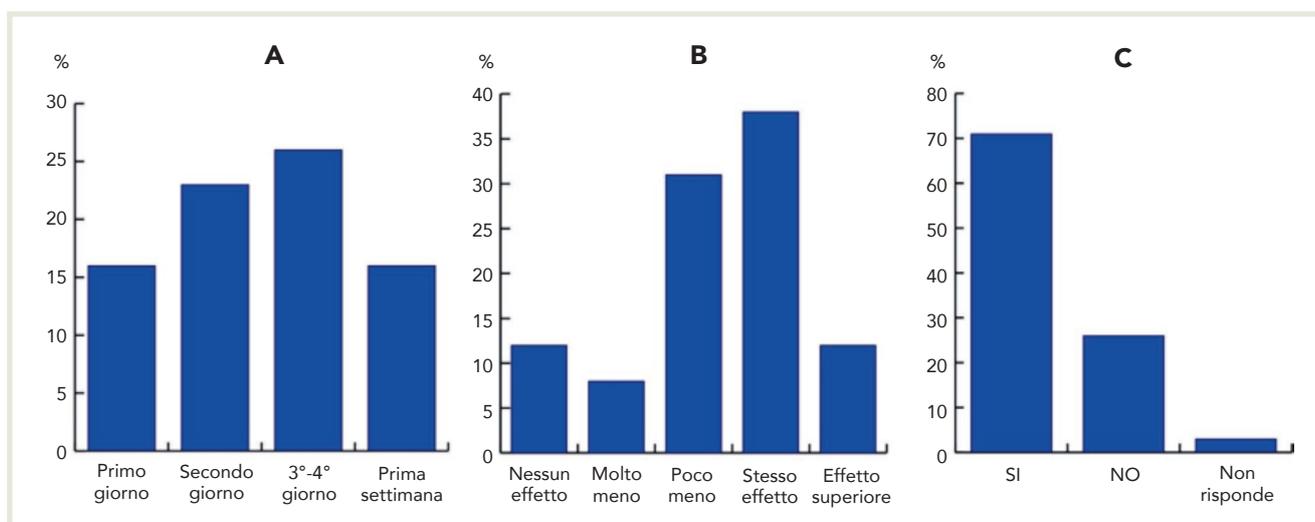
Gli estratti di pepe nero sono utilizzati da migliaia di anni. Diverse valutazioni, tra cui ematologica, chimica clinica, necroscopica e istopatologica non hanno mostrato effetti negativi significativi. PipeNig® è prodotto con procedure rigorose e la sicurezza del prodotto è garantita da sistemi di rilevamento di alta tecnologia (microbiologici, chimici e molecolari). Il BCP è tossico a dosi superiori a 2000 mg/kg di peso corporeo e per questo è stato riconosciuto dalla FDA come composto adatto all'impiego alimentare. PipeNig® è privo di piperina e pertanto può essere utilizzato anche in persone sensibili o allergiche alla piperina.

## Applicazioni e Modalità d'uso

L'attenta autenticazione del BCP bioattivo mediante GC-MS e la quantificazione e la standardizzazione mediante GC-FID sono necessarie per preparare dosi efficaci per l'attività analgesica. Il nostro studio pilota indica che PipeNig®-PWD e PipeNig®-FL sono candidati interessanti per lo sviluppo di nuovi preparati antidolorifici naturali per la riduzione delle patologie più dolorose. Secondo lo studio pilota qui riportato, il dosaggio raccomandato di PipeNig®-PWD è di 100 mg/dose. Questo dosaggio si è dimostrato efficace nelle fasi acute se somministrato due volte al giorno per almeno 10 giorni. PipeNig®-FL è una fonte liquida priva di alcool con il più alto contenuto di BCP (800 g/kg di BCP standardizzato) disponibile sul mercato ed è particolarmente adatta per tutte le applicazioni liquide, compresi i softgel. Il dosaggio di PipeNig®-FL è di 30-50 mg/dose.

## Bibliografia

1. Meza A, Lehmann C (2018) Betacaryophyllene - a phytocannabinoid as potential therapeutic modality for human sepsis? *Med Hypotheses* 110:68-70
2. Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen J-Z et al (2008) Betacaryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Nat Acad Sci U S A* 105:9099-9104
3. Bahi A, Mansouri S, Memari E, Ameri M, Nurulain SM et al (2014)  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiol Behav* 135:119-124
4. Katsuyama S, Mizoguchi H, Kuwahata H, Komatsu T, Nagaoka K et al (2013) Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in -caryophyllene-induced antinociception.



**Figura 2** - Risultato dello studio pilota condotto dalla Farmacia Centrale (Cambiano, Italia) su un campione bilanciato di 31 volontari che presentavano patologie del dolore acuto o cronico, dopo somministrazione di PipeNig® rispetto a diversi FANS. **(A)**: Tempistica della riduzione del dolore dopo la somministrazione di PipeNig®. **(B)**: Percezione dell'effetto di PipeNig® rispetto al FANS solitamente assunto per ridurre il dolore. **(C)**: Risposta dei volontari alla domanda se avrebbero usato ancora PipeNig® come antidolorifico. I valori sono espressi come percentuale sulle risposte.

Eur J Pain 17:664-6756

5. Kim C, Cho SK, Kim K-D, Nam D, Chung WS et al (2014)  $\beta$ -Caryophyllene oxide potentiates TNF  $\alpha$ -induced apoptosis and inhibits invasion through down-modulation of NF- $\kappa$ B-regulated gene products. *Apoptosis* 19:708-718
6. Rossi F, Bellini G, Luongo L, Manzo I, Tolone S et al (2016) Cannabinoid Receptor 2 as Antiobesity Target: Inflammation, Fat Storage, and Browning Modulation. *J Clin Endocrinol Metab* 101:3469-3478
7. Verty ANA, Stefanidis A, McAinch AJ, Hryciw DH, Oldfield B (2015) Anti-Obesity Effect of the CB2 Receptor Agonist JWH-015 in Diet-Induced Obese Mice. *Plos One* 10(11) doi:10.1371/journal.pone.0140592
8. Alberti TB, Barbosa WLR, Vieira JLF, Raposo NRB, Dutra RC (2017) (-)- $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 receptor-selective phytocannabinoid, suppresses motor paralysis and neuroinflammation in a murine model of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 18(4):691

**Per informazioni**

**Massimo E Maffei**

**tel 011 6705967**

**m.maffei@biosfered.com**

**www.biosfered.com**

**Biosfered** in a nutshell

Biosfered S.r.l. è un'azienda basata sulla ricerca e sviluppo in collaborazione con l'Università di Torino (DBIOS) che produce estratti liquidi o in polvere da matrici vegetali ottenuti attraverso tecniche e tecnologie brevettate basate su principi di Chimica Verde che non comportano l'uso di solventi tossici.

I prodotti sono chimicamente caratterizzati e titolati con l'uso delle più avanzate tecniche di spettrometria di massa e analisi (GC-MS, HPLC-DAD-FD-ESI-MS/MS). Il mercato di riferimento è rappresentato da applicazioni in campo farmaceutico, nutraceutico e delle industrie alimentari e cosmetiche.