

Il **chitosano** è un polisaccaride cationico lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina collegate in modo casuale (1-4) prodotte commercialmente dalla deacetilazione della chitina. Il peso molecolare del chitosano nelle preparazioni commerciali varia da 3.800 a 20.000 Da. Il chitosano è insolubile in acqua. Il grado di deacetilazione varia dal 60 al 100% nelle preparazioni commerciali.

La **chitina** un polisaccaride tra i più diffusi in natura: consiste in un glicano composto da unità  $\beta$  1-4 a unità di N-acetilglucosamina, componente dell'esoscheletro di crostacei e insetti nonché della parete cellulare dei funghi. Più spesso è ottenuta dai gusci di granchi e gamberi.

I COS **Chito-Oligosaccaridi (COS)** sono derivati del chitosano (polimeri policationici composti principalmente da unità di glucosamina) che possono essere prodotti sia tramite idrolisi enzimatica che chimica dal chitosano.

Recentemente, queste sostanze sono state oggetto di un aumento di attenzione da parte dei ricercatori nonché dei clinici nonché delle aziende produttrici di farmaci, integratori e cosmetici.

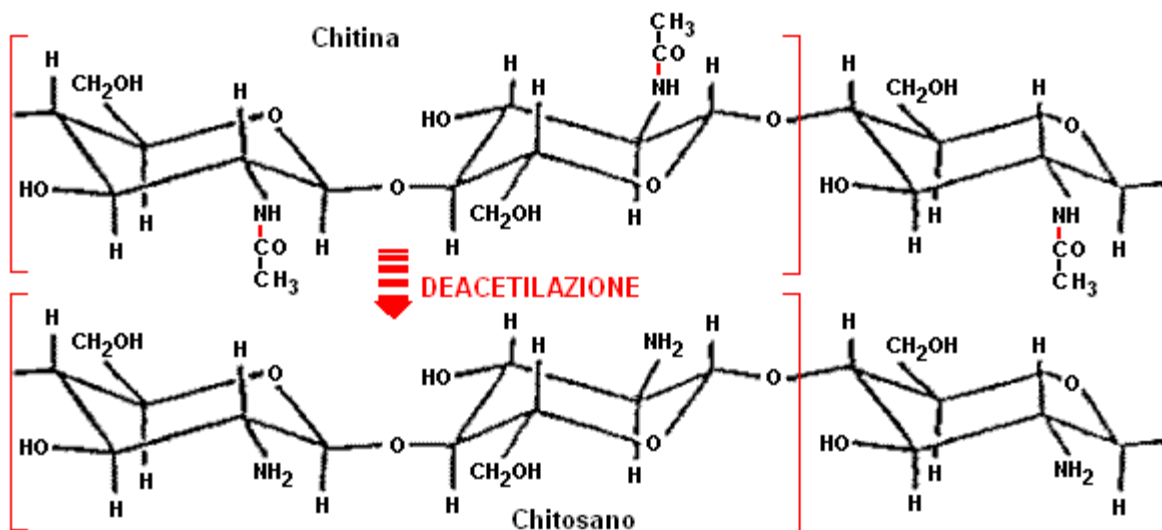


Fig. 1 Chitina e chitosano

### Aspetti regolatori

Il Chitosano è presente nella lista del **Ministero della Salute** (v. Rif.) relativa a “ALTRI NUTRIENTI E ALTRE SOSTANZE AD EFFETTO NUTRITIVO O FISILOGICO” (Revisione marzo 2018). Limiti ammessi: 3 g al giorno.

A livello UE, nel settore degli integratori alimentari, vi sono infatti disposizioni normative solo per l'impiego di vitamine e minerali (cfr. regolamento CE 1170/2009) e non per gli altri nutrienti e le altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico.

Tutte le sostanze contemplate dal regolamento (UE) 609/2013 per l'impiego nei prodotti ricadenti nel suo campo di applicazione sono impiegabili anche negli integratori alimentari. Resta ferma l'applicazione del regolamento (CE) 1924/2006 per indicazioni rispondenti alla definizione di claims sulla salute o sulla riduzione di un fattore di rischio di malattia, per cui nel vigente quadro normativo l'articolo 6, comma 4 lettera f) del decreto legislativo 21 maggio 2004, n. 169 è applicabile solo se non contrasta con il predetto regolamento. Eventuali indicazioni sulle

caratteristiche di un integratore non ricadenti nel campo di applicazione del regolamento (CE) 1924/2006, nell'ottica di orientare correttamente i consumatori nelle scelte, devono risultare conformi alle disposizioni vigenti in materia di etichettatura. Nella sezione "Eventuali indicazioni", in alcuni casi, sono riportate esemplificazioni di proprietà volte a fornire informazioni per orientare i consumatori nelle scelte che non si configurano come claims sulla salute.

Relativamente ai claims sulla salute del chitosano si è invece espressa l' **EFSA** (*European Food Safety Authority*), che ne ha appunto valutate le attività biologiche e salutistiche, riconosciute e validate dal gruppo dei suoi esperti scientifici, i quali ritengono il chitosano costituente alimentare, oggetto delle indicazioni sulla salute, sufficientemente caratterizzato.

Cinque studi sugli animali e uno studio sull'uomo relativo agli effetti del chitosano sui lipidi nel sangue fornendo dati per la fondatezza scientifica dell'indicazione.

Gli esperti dell' EFSA hanno valutato la revisione sistematica della **Cochrane collaboration (Jull et al., 2008)** relativa agli effetti del chitosano sui lipidi del sangue e ha incluso l'unico studio di intervento umano presentato per la fondatezza scientifica dell'indicazione.

Il gruppo di esperti scientifici ha osservato che il consumo di chitosano ha mostrato un piccolo ma statisticamente significativo effetto sulla riduzione sia delle concentrazioni totali (combinando cinque studi) che del colesterolo LDL (combinando due studi), nessun effetto è stato osservato sulle concentrazioni di colesterolo HDL.

**Concludono che è stato stabilito un rapporto di causa ed effetto tra il consumo di chitosano e il mantenimento delle normali concentrazioni di colesterolo LDL nel sangue.**

La seguente formulazione riflette le prove scientifiche: "Il chitosano può contribuire a mantenere normali livelli di colesterolo nel sangue".

Il chitosano nel controllo del peso: le valutazioni degli esperti scientifici dell'EFSA non consentono di stabilire un rapporto di causa ed effetto tra il consumo di chitosano e la riduzione del peso corporeo. Tuttavia la struttura del chitosano può sequestrare nell'intestino parte dei grassi introdotti per via alimentare e dare un contributo al regime dietetico personalizzato.

### **Efficacia: analisi dei dati**

Analisi statistiche che combinano i nove studi inseriti nella **revisione della Cochrane** hanno fornito dati sulle concentrazioni totali di colesterolo (Colombo e Sciutto, 1996; Ho et al., 2001; Kaats et al., 2006; Macchi, 1996; Ni Mhurchu et al., 2004; Pittler et al. , 1999; Veneroni et al., 1996; Wuolijoki et al., 1999; Zahorska-Markiewicz et al., 2002) e sono stati riportati nella meta-analisi. Tuttavia, il gruppo di esperti scientifici osserva che alcuni di questi studi hanno utilizzato preparati per il trattamento che contenevano altri principi attivi oltre al chitosano e ritiene che non si possano trarre conclusioni da tali analisi per la fondatezza scientifica dell'indicazione. Quando gli studi erano limitati a quelli che usavano il solo chitosano come intervento (Ho et al., 2001; Macchi, 1996; Ni Mhurchu et al., 2004; Pittler et al., 1999; Zahorska-Markiewicz et al., 2002), è stata osservata una riduzione piccola ma statisticamente significativa delle concentrazioni di colesterolo totale di  $-0,15$  mmol / L (95% CI  $-0,23$  a  $-0,07$ ,  $p = 0,0002$ ).

Risultati analoghi sono stati ottenuti quando le analisi erano limitate a studi che soddisfacevano i criteri di qualità di occultamento dell'allocazione (Ni Mhurchu et al., 2004; Pittler et al., 1999) ( $-0,15$  mmol / L; 95% CI  $-0,23$  a  $-0,07$ ,  $p = 0,0004$ ). La statistica I<sup>2</sup> indicava una sostanziale eterogeneità (I<sup>2</sup> = 59,5%).

Analisi statistiche combinando i sette studi che includevano dati sulle concentrazioni di colesterolo LDL (Colombo e Sciotto, 1996; Ho et al., 2001; Kaats et al., 2006; Ni Mhurchu et al., 2004; Veneroni et al., 1996; Wuolijoki et al., 1999; Zahorska-Markiewicz et al., 2002) sono stati forniti nella meta-analisi. Tuttavia, il gruppo di esperti scientifici osserva che quattro di questi studi hanno utilizzato preparati per il trattamento che contenevano altri principi attivi oltre al chitosano (Colombo e Sciotto, 1996; Kaats et al., 2006; Veneroni et al., 1996; Wuolijoki et al., 1999) e che non è stata fornita alcuna analisi separata delle prove che usavano il chitosano da solo. Il gruppo di esperti osserva, tuttavia, che mentre gli studi di Ho et al. (2001) e Zahorska-Markiewicz et al. (2002), compresi rispettivamente 68 e 32 soggetti, non hanno mostrato un effetto significativo sulle concentrazioni di colesterolo LDL, il più grande studio, di Ni Mhurchu et al. (2004), che comprendeva 250 soggetti (125 per gruppo), hanno osservato una riduzione piccola ma statisticamente significativa delle concentrazioni di colesterolo LDL a favore del chitosano (-0,12 mmol / L, 95% CI -0,19 a -0,05). Risultati simili sono stati ottenuti quando l'analisi era limitata ai due studi della durata di 6 mesi (-0,14 mmol / L, 95% CI -0,19 a -0,06) (Ni Mhurchu et al., 2004; Zahorska-Markiewicz et al., 2002). Analisi statistiche che combinano i sette studi che hanno fornito dati sulle concentrazioni di colesterolo HDL (Colombo e Sciotto, 1996; Ho et al., 2001; Kaats et al., 2006; Macchi, 1996; Ni Mhurchu et al., 2004; Veneroni et al., 1996; Zahorska-Markiewicz et al., 2002).

Il gruppo di esperti scientifici osserva che tre di questi studi hanno utilizzato preparati per il trattamento che contenevano altri principi attivi oltre al chitosano (Colombo e Sciotto, 1996; Kaats et al., 2006; Veneroni et al., 1996), e che nessuna analisi separata delle prove utilizzando il chitosano da solo è stata fornita nella meta-analisi. Il gruppo di esperti osserva inoltre che solo il più piccolo studio che utilizzava il chitosano da solo ha mostrato un aumento statisticamente significativo delle concentrazioni di colesterolo HDL rispetto al placebo (0,15 mmol / L, 95% CI 0,03-0,77, 10 soggetti per gruppo) (Macchi, 1996), nessuna differenza significativa tra chitosano e placebo sono stati osservati in uno qualsiasi degli altri tre studi, incluso il più grande studio di NiMhurchu et al. (2004), che ha avuto la durata più lunga (6 mesi).

Un'altra **metanalisi di studi clinici controllati** (Baker W. et al., 2009) relativa alla valutazione d'efficacia del chitosano come agente ipocolesterolemizzante è stata condotta mediante una ricerca sistematica di letteratura su Medline, Embase, Cochrane Central e il database completo di Natural Medicines è stata condotta fino a maggio 2008. Selezionati studi clinici randomizzati, controllati di chitosano vs placebo in pazienti ipercolesterolemici e segnalati dati di efficacia su lipoproteine totali, a bassa densità (LDL), colesterolo o trigliceridi ad alta densità di lipoproteine (HDL).

Dai risultati emerge come 6 studi (n = 416 pazienti) hanno soddisfatto i criteri di inclusione. In seguito alla meta-analisi, l'uso del chitosano ha abbassato significativamente il colesterolo totale [WMD, -11,59 mg / dl (-21,45-1,73), p = 0,02] ma non il colesterolo LDL, il colesterolo HDL o i trigliceridi.

E gli Autori concludono che sulla base della letteratura il chitosano influisce positivamente sul colesterolo totale con una confidenza del 95%. Sono necessari ulteriori studi randomizzati controllati più ampi per caratterizzare meglio l'effetto del chitosano su altre lipoproteine.

### **Attività anti-aterogena**

Recenti lavori (Rawal T. et al. 2018) dimostrano come il chitosano comporti sperimentalmente una riduzione degli indici aterogenici, dei parametri di stress ossidativo e della placca ateromasica sono stati dimostrati nell'animale da esperimento reso iperlipidemico con chitosano somministrato

mediante in forma di nanoparticelle per migliorare l'efficacia della sostanza.

La riduzione del danno all'endotelio e al nucleo lipidico è stata osservata sui campioni istologici dell' **arteria carotidea** degli animali trattati rispetto al Polaxamer 407 che induceva la formazione di trombi nell'arteria a causa dell'accumulo di lipidi e della formazione di specie reattive dell'ossigeno. Il trattamento ha ridotto l'accumulo lipidico nelle arterie coronariche, indicando il suo effetto benefico contro il rischio trombotico.

Sono stati dimostrati effetti ipolipemizzanti nei ratti e la promozione del trasporto inverso del colesterolo (RCT) nei topi, (*Yang Yu, et al., 2015*), suggerendo che il COS potrebbe essere un potenziale materiale atero-protettivo. Gli effetti del trattamento COS sull'aterosclerosi (AS) sono stati studiati in topi deficienti di apolipoproteina E (apoE - / -). Dopo aver somministrato una dieta ad alto contenuto di grassi per 12 settimane con la somministrazione gastrica di COS o veicolo, rispettivamente, i topi sono stati sacrificati per la valutazione dell'aterosclerosi, della stabilità della placca e del meccanismo d'azione. Il colesterolo e i TG nelle frazioni di lipoproteine non ad alta densità (non HDL) sono stati ridotti drasticamente nei gruppi COS. Il trattamento COS ha ridotto le aree di lesione di superficie aortica, le aree della placca nella radice aortica e la stabilità della placca aumentata in apoE - / -. Inoltre, il trattamento COS ha significativamente migliorato l'espressione del recettore della lipoproteina a bassa densità epatica (LDL-R), del recettore scavenger BI (SR-BI) così come l'espressione di macrofagi SR-BI e ABCA1. Gli Autori concludono che questi trattamenti attenuano il processo di aterosclerosi e contribuiscono alla diminuzione del livello plasmatico non-HDL in apoE - / -. Un potenziale meccanismo potrebbe veder coinvolta l'espressione potenziata del LDL-R epatico, SR-BI e ABCA1 dei macrofagi .

### **Sicurezza d'uso**

Uno studio clinico (Tapola et al, 2008) ha valutato la sicurezza d'uso del chitosano analizzando l'effetto di due diverse dosi di chitosano sulle concentrazioni sieriche di vitamine liposolubili, le concentrazioni di colesterolo e altri parametri di sicurezza. Un totale di 65 uomini e donne ha consumato 0, 4,5, 6,75 g al giorno di chitosano o 6,75 g al giorno di glucomannano per otto settimane in uno studio parallelo, controllato con placebo, in singolo cieco. Complessivamente, 56 partecipanti hanno completato lo studio.

Nello studio non sono state rilevate differenze tra i trattamenti in vitamine sieriche (vitamina A, vitamina E, 25-idrossivitamina D), caroteni (- e -carotene), misure di chimica clinica o ematologia. Le variazioni nel totale e le concentrazioni di colesterolo LDL tra i gruppi di studio non erano statisticamente significative.

### **Meccanismo d'azione**

Le teorie più accreditate presumono che il CH riduca l'assorbimento di grassi nella dieta intrappolando il grasso nel lume gastrico. Il pH molto basso del lume gastrico induce la gelificazione del CH e, quindi, l'intrappolamento dei grassi, meccanismo più plausibile mediante il quale il CH interferisce con l'assorbimento del grasso nella prima parte del tratto enterico mentre interagisce con gli acidi colici.

Anche gli esperti dell' EFSA stabiliscono che il meccanismo mediante il quale si presume che il chitosano eserciti l'effetto dichiarato è quello di legarsi ai lipidi caricati negativamente, riducendone quindi il loro assorbimento gastro-intestinale, e questi effetti sono stati osservati in

alcuni studi sugli animali (Deuchi et al., 1995; Sugano et al., 1980; Zacour et al., 1992). Gli effetti del chitosano sull'escrezione di grasso fecale 24 h in volontari umani sani a dosi di circa 3 g al giorno non erano statisticamente significativi (Guerciolini et al., 2001)..

Nel valutare le prove, il gruppo di esperti scientifici ha tenuto conto del fatto che una meta-analisi di RCT, che ha esaminato gli effetti del consumo di chitosano sui lipidi nel sangue, ha mostrato una riduzione piccola ma statisticamente significativa delle concentrazioni totali e di colesterolo LDL.

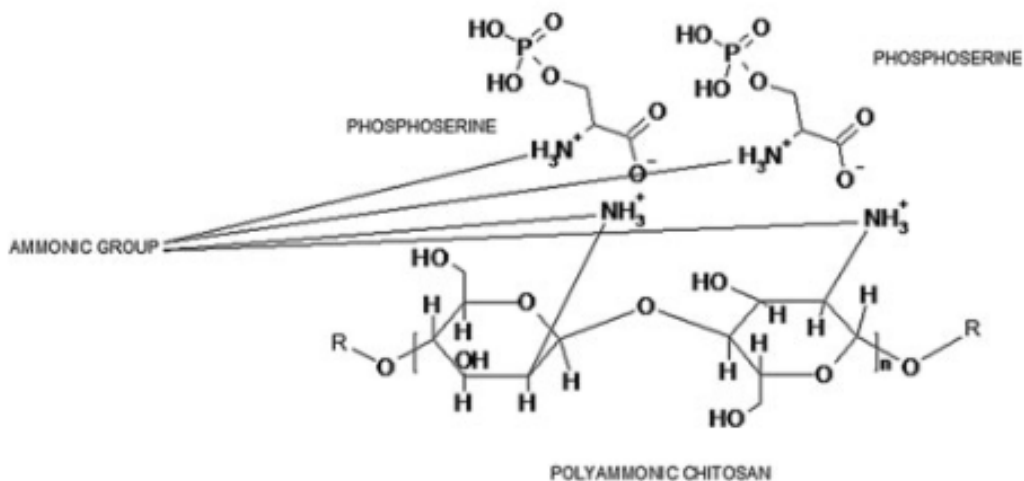
*Fratter et al. (2014)* hanno condotto studi sperimentali preliminari di una nuova formulazione contenente sale di chitosano in grado di interferire efficacemente con i processi di emulsificazione del sale biliari e, di conseguenza, ridurre l'assorbimento di grassi nella dieta.

La tecnologia brevettata CONTIENE UNA TECNOLOGIA OGGETTO DI DOMANDA DI BREVETTO EU (N: EP2983644) ha dimostrato valutato la capacità di un complesso di eccipienti di precipitare gli acidi biliari, di inibire l'assorbimento del colesterolo e dei trigliceridi.

Alla rottura delle micelle consegue che i grassi non sono più emulsionati e quindi non possono essere assorbiti, potendo così contribuire alla prevenzione e/o trattamento dei disturbi quali ipercolesterolemia, iperlipidemia e aterosclerosi.

Una miscela di SIF (fluido intestinale simulato) e di acido glicolico (acido biliare) è stata messa in contatto per 1 ora con 100 mg di questo **complesso di Eccipienti** o 1 g di **Colesteramina** evidenziando come i 100 mg del complesso di eccipienti inducano il sequestro dell' 82,1% di acido glicolico, contro il 99,3 di 1 gr di colestiramina.

In particolare Fratter et al. descrivono per la prima volta, una nuova associazione tra Chitosano e DL-fosfoserina (PS) (Fig. 2), un fosfino-amminoacido di tipo alimentare unico che viene solitamente utilizzato negli integratori da banco e nutrizionali per migliorare le prestazioni cerebrali. DL-PS crea un sale poli-ammonico di CH che è potenzialmente in grado di formare complessi con sali biliari, anche nel mezzo pseudo-neutro del duodeno.



Formation of CHITOSAN-PHOSPHOSERINE salt

Fig. 2

### Interazione dell'emulsione di grassi con chitosano

Per studiare l'interazione tra l'emulsione di grasso dietetico enterico e la polvere di CH-PS, 2 g di polvere contenente CH e PS (1 e 1,25 g, rispettivamente) sono stati aggiunti al becher contenente il modello di emulsione. La miscela è stata mantenuta a 37 ° C a 200 rpm agitando con una sonda pH introdotta. Dopo alcuni secondi, l'emulsione mostrava segni preliminari di inversione di fase e si verificava una rottura completa dell'emulsione. Allo stesso tempo, materiale abbondante si è raccolto sul fondo del becher, identificato come la precipitazione dei complessi STUDC-CH. Uno strato di grasso separato dalla superficie del becher (figura 3d).

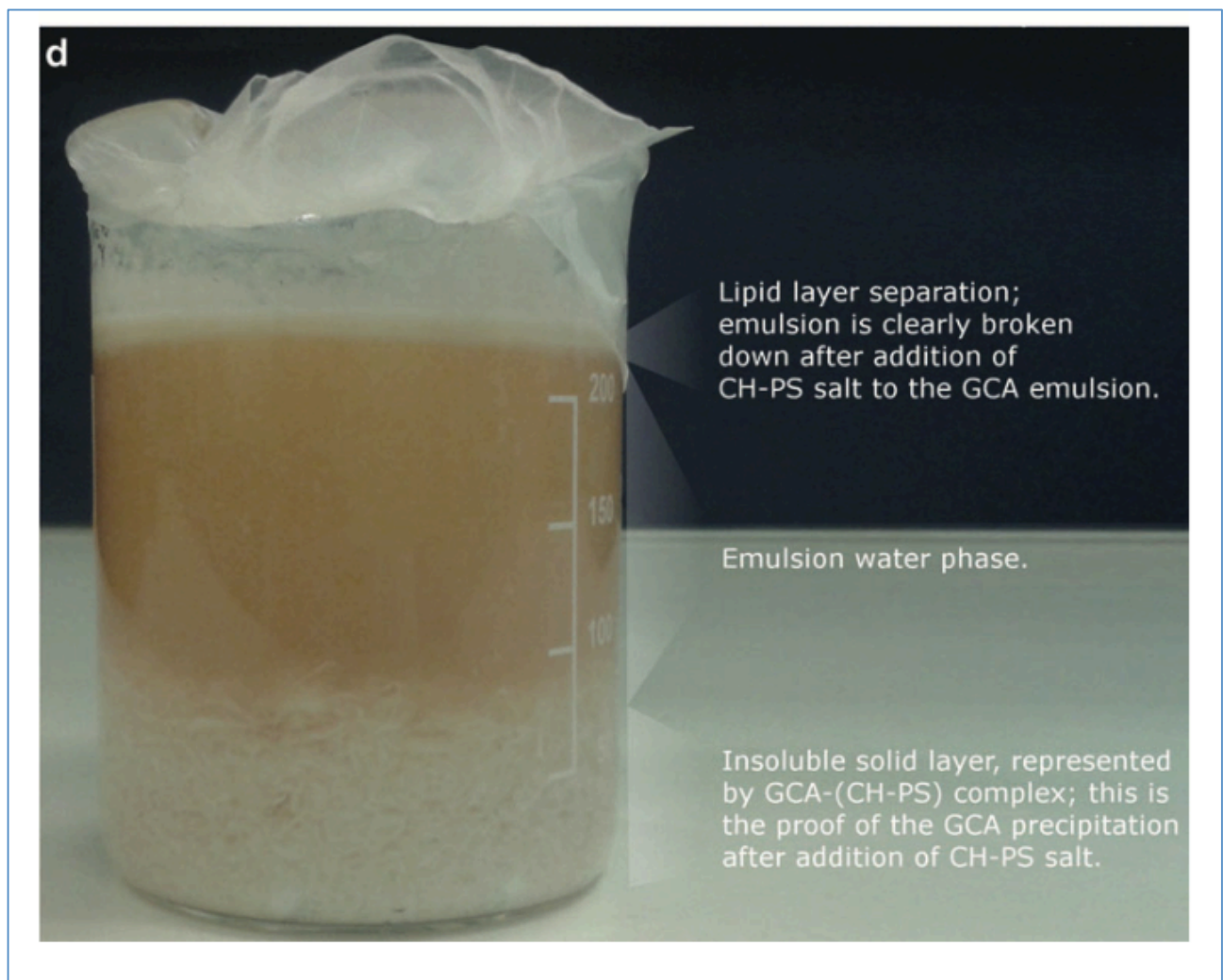


Fig. 3

(da Fratter, 2014)

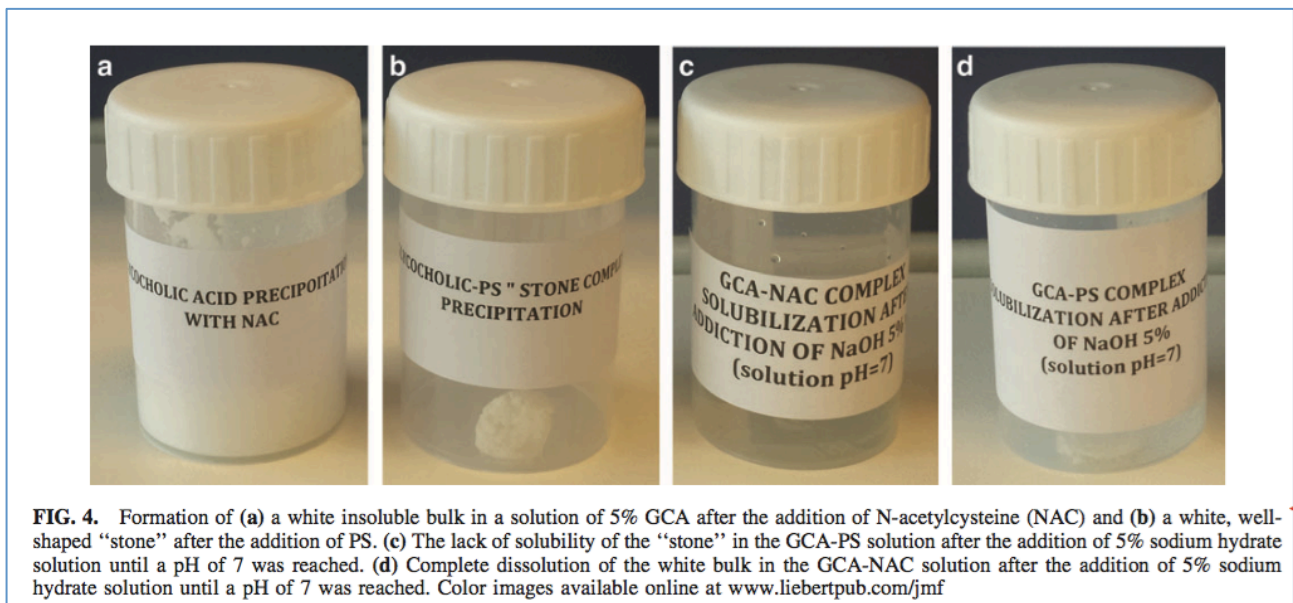
Significativamente, è stato osservato che il pH del sistema è diminuito da circa 7.0 (6.9) a 4.6 e infine ha raggiunto un pH di 4.2. A questo pH finale, CH è, per la maggior parte, protonato per formare una polielettrolita. Questo valore di pH corrobora l'ipotesi che quando il CH è protonato per formare una polielettrolita ammoniaca nella prima parte del tratto enterico, si verifica una completa ed efficace formazione di complessi di sali biliari e una drammatica distruzione delle strutture micellari contenenti grassi. Questo fenomeno riduce l'assorbimento di grasso nel duodeno e nel digiuno e, quindi, altera irreversibilmente il processo che porta all'assorbimento di grassi nella dieta.

Per creare una nuova forma farmaceutica contenente il sale CH-PS, è necessario creare una busta resistente alla gastrica che consenta al sale CH-PS di dissolversi liberamente nei fluidi acquosi della prima parte del tratto enterico e che consenta la interazione tra la policizzazione CH-PS e i sali biliari, che promuove la loro precipitazione (Fratter, 2014).

### Formazione legame acido glicolico-PS

Per dimostrare l'ipotesi con la quale PS è in grado di formare complessi insolubili con CH, abbiamo condotto un test di precipitazione di GCA sia con PS che con un altro aminoacido acido che non aveva un gruppo ammonico. Una soluzione di GCA al 5,0% p / v in soluzione fisiologica è stata preparata secondo il metodo descritto.

La soluzione è stata divisa in due bicchieri di vetro. Aliquote di N-acetilcisteina (NAC, 500 mg) sono state aggiunte a uno dei becher. NAC è un aminoacido solforato acido in cui un gruppo amminico è acetilato per impedire la formazione di un gruppo ammonico. Pochi secondi dopo l'aggiunta di NAC, un precipitato strutturato bianco ha cominciato a formare un viscoso uniforme F4c bulk (Fig. 4a).



(da Fratter, 2014)

Successivamente, 500 mg di PS sono stati aggiunti al secondo bicchiere di Soluzione GCA. Solo pochi secondi dopo l'aggiunta di PS, una "pietra" bianca, solida e ben formata si è formata sul fondo del becher. Alcune altre piccole pietre si sono formate attorno al becher. In ciascuno dei bicchieri, il pH finale ha raggiunto 5.0 (figura 4b).

Per verificare la formazione di un complesso insolubile tra GCA e PS e la mancanza di formazione dello stesso complesso insolubile tra GCA e NAC, è stata aggiunta una soluzione di sodio idrato al 5,0% p / v a entrambe le dispersioni per forzare la preparazione a ritornare al pH originale della soluzione enterica iniziale e verificare o la completa dissoluzione del precipitato solido o la sua insolubilità. L'aggiunta di soluzione di sodio idrato 5,0% alla soluzione GCA-NAC ha prodotto una dissoluzione completa della massa bianca solida precedentemente evidente a pH 5 (figura 4c). Il l'aggiunta di soluzione di sodio idrato al 5,0% alla soluzione GCA-PS non ha prodotto una completa dissoluzione del sistema e la "pietra" bianca è rimasta sul fondo del becher. In ciascuna delle dispersioni, il pH finale era 7.0 (figura 4d). La pietra era separata dalla soluzione circostante e

sembrava molto dura con una struttura simile alla pelle. La formazione della pietra rappresenta chiaramente il risultato della formazione irreversibile di un complesso GCA-PS.

I risultati di Fratter et al. mostrano che Chitosano, quando esiste in una forma policationica nella prima parte del lume enterico, è in grado di complessare con i sali biliari e di conseguenza di spostarli dalle strutture emulsioni-micellari in cui i grassi e il colesterolo sono intrappolati.

È probabile che questo meccanismo chimico si verifichi quando il Chitosano viene consumata come preparazione orale negli integratori alimentari, come una capsula o una compressa compressa. Con questi metodi di consumo, il CH può esistere nel liquido gastrico come una policizzazione ammonica fino a raggiungere la prima parte del tratto enterico in cui il pH aumenta fino a più di 7 e si verifica la deprotonazione dei gruppi ammoniaci. In questa forma chimica, CH non è in grado di interagire con i sali biliari e di spostarli dalle strutture micellari. PS è un fosfo-amminoacido acido che è molto solubile in acqua con un forte comportamento acido derivato dal gruppo fosforico. Ciò enfatizza il carattere acido della molecola e consente tre funzioni acide e tre  $pK_A$  relativi. Il primo  $pK_A$  ha un valore di 2.1, che indica un forte profilo acido della molecola nel mezzo acquoso; è utile per protonare i gruppi di aminoacidi CH e creare una policizzazione dell'ammoniaca. Un'altra caratteristica interessante di questa molecola è che esprime una funzione ammonica stessa. PS è un aminoacido e il suo stato naturale è come una zwitterione con il gruppo amminico protonato e il gruppo carbossilico sotto forma di carbossilato. Il raddoppio della formazione del sale poliammonico nella struttura CH e la presenza di una funzione amologica nella molecola PS supportano la logica di una precipitazione più efficace e irreversibile dei sali biliari rispetto a un semplice sale CH, che è un acido che non possiede una funzione cationica ammonica.

Questi esperimenti forniscono prove preliminari che questo nuovo sale di CH può interagire efficacemente con i sali biliari nel duodeno e alterare le strutture micellari necessarie per assorbire i grassi. La formazione di un complesso insolubile tra GC e PS, che non è reversibile una volta trasferito su un mezzo alcalino, sembra impedire lo spostamento dei complessi di sale della CH-bile che si formano quando si verifica un aumento significativo del pH. Il mezzo nel duodeno è protetto fisicamente per tamponare l'acido in eccesso proveniente dallo stomaco. Pertanto, la formazione di un complesso irreversibile tra i sali biliari e il sale CH-PS garantisce un'efficace precipitazione del sale biliare, indipendentemente dal pH del mezzo.

Questa è la scoperta più importante riportata da Fratter et al. dimostrata dai test chimici che hanno simulato un accurato modello di micellizzazione del grasso che ha coinvolto i due principali sali biliari, TCA e GCA. Affinché queste condizioni siano fattibili, è necessario creare un sistema di somministrazione farmaceutico resistente alla gastrite, come una compressa, una capsula o un granulato con un guscio resistente alla gastrite. Forse, un tale sistema potrebbe utilizzare una miscela di polimeri metacrilici (Eudragit<sup>TM</sup>), che sono in grado di proteggere un nucleo interno contenente CH e PS dal contatto con fluidi gastrici. Il sistema di somministrazione potrebbe portare il nucleo nella prima parte del tratto enterico dove l'involucro resistente alla gastro- ma si dissolverebbe rapidamente e CH e PS potrebbero funzionare come descritto in precedenza.

Un'altra prospettiva suggerita è quella di esplorare la formazione di un sale CH-PS attraverso un processo chimico, come una tecnica di granulazione a secco spray-dry, e introdurlo direttamente in una capsula o comprimere la polvere finale in una compressa. Questo sistema di



somministrazione potrebbe accelerare la precipitazione dei sali biliari nel duodeno e sarebbe meno dipendente dall'interazione chimica e fisica tra CH e PS durante il processo di salificazione che avviene in vivo.

I risultati preliminari e le osservazioni descritte da Fratter et al. espongono il panorama di nuove forme farmaceutiche in cui sia il CH con un alto grado di deacetilazione sia un acido organico con un forte profilo acido, idrosolubilità e un gruppo ammonico vengono introdotti nel nucleo interno di un capsula, compressa o granulato gastroresistente per favorire la dissoluzione e la protonazione del CH nella prima parte del tratto enterico e la conseguente precipitazione dei sali biliari. Sia CH che PS dovrebbero essere introdotti in un rapporto che permetta l'acidificazione della prima parte del tratto enterico in per superare il pH pseudo-neutro di questa regione. Nonostante l'assenza di solide determinazioni analitiche e quantitative, gli esperimenti preliminari di laboratorio condotti in questo studio dimostrano la sostenibilità scientifica del meccanismo d'azione chimico di CH e sottolineano il ruolo chiave del pH del mezzo in cui questa attività deve svolgersi. Anche se la formazione di un ambiente acido nei fluidi della prima parte del tratto enterico è breve, la condizione consente la completa protonazione di CH e la precipitazione dei sali biliari.

Sono necessarie due caratteristiche per migliorare l'efficacia di questa nuova preparazione: la completa solubilità in acqua dell'acido scelto per protonare il CH e la sua capacità di esprimere gruppi ammoniaci. In futuro, dovrebbe essere condotta una valutazione dell'efficacia clinica di tale forma farmaceutica gastroresistente contenente CH-PS per convalidare le teorie presentate qui e per confermare le prove sperimentali preliminari. Inoltre, una convalida contestuale dei meccanismi teorici di azione qui proposti, insieme a una determinazione analitica e strumentale della precipitazione del sale biliare e una titolazione dei grassi nelle feci dopo il consumo orale di queste nuove formulazioni, dovrebbe essere condotta prima in un modello animale e poi negli umani. L'obiettivo principale di questo lavoro era offrire una prova preliminare della fattibilità di una nuova formulazione contenente sale CH in grado di interferire efficacemente con il processo primario di assorbimento del grasso negli esseri umani.

### **Vitamine e minerali coadiuvanti**

Vitamine e minerali presenti in alimenti e nei casi di necessità presenti in integratori specifici possono coadiuvare nella prevenzione del rischio cardiovascolare

Oltre ai noti effetti sulla pressione arteriosa della dieta ed in particolare della mediterranea, un gran numero di studi ha studiato il possibile effetto di riduzione della pressione sanguigna di diversi integratori alimentari e nutraceutici, la maggior parte dei quali sono agenti antiossidanti con un elevato livello di tollerabilità e profilo di sicurezza. Vi sono prove a supporto dell'uso di potassio, magnesio, L-arginina, vitamina C, flavonoidi di cacao, succo di barbabietola, coenzima Q10, ecc. L'effetto antipertensivo di tutti questi nutraceutici sembra essere dose-correlato e la tollerabilità complessiva è buona.

Anche se sono necessarie ulteriori ricerche cliniche per identificare dai nutraceutici attivi disponibili quelli con il miglior rapporto costo-beneficio e rapporto rischio / beneficio per l'uso diffuso ea lungo termine nella popolazione generale con un rischio cardiovascolare basso aggiunto correlato all'ipertensione non complicata, alcuni nutraceutici potrebbero avere un impatto positivo sulla BP negli esseri umani (Borghi C, Cicero AF. 2017)

### **Magnesio**

L'ipertensione arteriosa è una malattia con una patogenesi complessa. Nonostante la notevole conoscenza di questa malattia socialmente significativa, il ruolo della carenza di magnesio come fattore di rischio non è completamente compreso (Kostov K et al. 2018).

Il magnesio è un antagonista naturale del calcio. Potenzia la produzione di mediatori vasodilatatori locali (prostaciclina e ossido nitrico) e altera le risposte vascolari a una varietà di sostanze vasoattive (endotelina-1, angiotensina II e catecolamine). La carenza di Mg stimola la produzione di aldosterone e potenzia la risposta infiammatoria vascolare, mentre l'espressione / l'attività di vari enzimi antiossidanti (glutazione perossidasi, superossido dismutasi e catalasi) e i livelli di importanti antiossidanti (vitamina C, vitamina E e selenio) diminuiscono. Il magnesio bilancia gli effetti delle catecolamine nello stress acuto e cronico. La carenza di Mg può essere associata allo sviluppo di insulino-resistenza, iperglicemia e cambiamenti nel metabolismo lipidico, che migliorano i cambiamenti aterosclerotici e la rigidità arteriosa. Il magnesio regola il ricambio di collagene ed elastina nell'attività della parete vascolare e della metalloproteinasi della matrice. Il magnesio aiuta a proteggere le fibre elastiche dalla deposizione di calcio e mantiene l'elasticità dei vasi. Considerando i numerosi effetti positivi su una serie di meccanismi correlati all'ipertensione arteriosa, il consumo di una dieta sana che fornisce la quantità raccomandata di magnesio può essere una strategia appropriata per aiutare a controllare la pressione sanguigna. (Kostov K et al. 2018).

È stata inoltre trovata una relazione inversa tra l'assunzione di **magnesio** (Mg ++ ) e ipertensione. Una meta-analisi di RCT con 3-24 settimane di follow-up ha concluso che la supplementazione di Mg ++ è associata a una diminuzione della sistolica di  $3-4 \pm 2$  mmHg e in una DBP di  $2,5 \pm 1$  mmHg, che è ulteriormente aumentata con crossover progettato prove e assunzione > 370 mg al giorno-1 [46]. L'effetto ipoglicemizzante di Mg ++ sembra essere additivo all'effetto di K + alto e basso Na +, sia nei soggetti ipertesi trattati che non trattati. Sono stati proposti numerosi meccanismi per spiegare la riduzione della PA indotta da Mg ++: un calcio (Ca ++ ) - azione di blocco dei canali, un aumento della prostaglandina (PG) E e un aumento della sintesi di NO. (Borghi C, Cicero AF. 2017)

Importante una **recente meta-analisi** (Darooghegi Mofrad M. et al. 2018) è stata condotta per valutare gli effetti dell'integrazione di magnesio sulla funzione endoteliale, dilatazione mediata dal flusso (FMD) e lo spessore medio dell'intima carotidea (CIMT)

Ricerche di letteratura di pubblicazioni inglesi in database MEDLINE e EMBASE sono state condotte fino a novembre 2017. I risultati sono riportati come differenza media ponderata (MD) con intervalli di confidenza al 95% (CI) utilizzando il modello di effetti casuali (metodo DerSimonian-Laird). Il test Q di Cochrane e l'I-quadrato (I2) sono stati usati per determinare l'eterogeneità tra gli studi inclusi. Per determinare le potenziali fonti di eterogeneità, l'analisi dei sottogruppi è stata condotta per criteri predefiniti. Tramite l'imbuto e il test di regressione di Egger sono stati utilizzati per valutare l'errore di pubblicazione. Sono stati inclusi sette RCT con 306 partecipanti. La supplementazione di Mg ha aumentato significativamente l'afta epizootica (MD: 2,97, IC 95%: da 0,23 a 5,70%,  $p = 0,033$ ). Tra gli studi l'eterogeneità era alta e l'analisi dei sottogruppi non è stata in grado di identificare le fonti di eterogeneità. La supplementazione di magnesio non ha avuto effetti significativi su CIMT (MD: -0,13 mm, IC 95%: 0,27, 0,01,  $p = 0,077$ ) con elevata eterogeneità. La dose di Mg, la durata del trattamento, lo stato di salute, il CIMT al basale e la dimensione del campione erano le potenziali fonti di eterogeneità. La supplementazione di Mg potrebbe diminuire il CIMT in misura maggiore nei pazienti in emodialisi (HD); dosi più basse di Mg, maggiore

dimensione del campione e durata del follow-up e soggetti con CIMT basale più elevato hanno anche ridotto l'eterogeneità in una certa misura ( $p < 0,001$ ).

Gli Autori concludono affermando che la supplementazione di magnesio può migliorare la funzione endoteliale senza intaccare lo spessore della media intima carotidea.

## **Vitamine**

Tra le vitamine che fisiologicamente contribuiscono alla riduzione del rischio cardiovascolare vi sono le vitamine del gruppo B (B3, B6, B12) che agiscono come fattori lipotropi favorendo anche la riduzione dell'omocisteina, e la vitamina C.

### **Vitamine gruppo B**

Circa la metà di tutti i decessi sono dovuti a malattie cardiovascolari e alle sue complicanze. L'onere economico per la società e il sistema sanitario derivante da disabilità, complicazioni e trattamenti cardiovascolari è enorme e sta diventando più grande nelle popolazioni che invecchiano rapidamente nei paesi sviluppati. Poiché i fattori di rischio convenzionali non riescono a spiegare una parte dei casi, l'omocisteina, un "nuovo" fattore di rischio, viene vista con crescente interesse. L'omocisteina è un prodotto intermedio contenente zolfo nel normale metabolismo della metionina, un amminoacido essenziale. Carenze di acido folico, vitamina B12 e vitamina B6 e attività enzimatica ridotta inibiscono la degradazione dell'omocisteina, aumentando così la concentrazione intracellulare di omocisteina. (Stanger O, et al. 2003)

Numerosi studi retrospettivi e prospettici hanno costantemente trovato una relazione indipendente tra iperomocisteinemia lieve e malattia cardiovascolare o mortalità per tutte le cause. A partire da una concentrazione plasmatica di omocisteina di circa 10 micromoli / l, l'aumento del rischio segue una relazione dose-risposta lineare senza livello soglia specifico. L'iperomocisteinemia come fattore di rischio indipendente per le malattie cardiovascolari è ritenuta responsabile di circa il 10% del rischio totale. Livelli elevati di omocisteina plasmatica ( $> 12$  micromol / l; iperomocisteinemia moderata) sono considerati citotossici e sono presenti nel 5-10% della popolazione generale e fino al 40% dei pazienti con malattia vascolare. Ulteriori fattori di rischio (fumo, ipertensione arteriosa, diabete e iperlipidemia) possono essere additivi o, interagendo con l'omocisteina, sinergicamente (e quindi eccessivamente proporzionalmente) aumentano il rischio complessivo. L'iperomocisteinemia è associata ad alterazioni della morfologia vascolare, perdita della funzione anti-trombotica endoteliale e induzione di un ambiente procoagulante. Le forme più conosciute di danni o lesioni sono dovute allo stress ossidativo mediato dall'omocisteina. Soprattutto quando agiscono come antagonisti diretti o indiretti di cofattori e attività enzimatiche, numerosi agenti, farmaci, malattie e fattori legati allo stile di vita hanno un impatto sul metabolismo dell'omocisteina.

Coerentemente con altri gruppi di lavoro e gruppi di consenso, è raccomandato un livello target di omocisteina plasmatico  $< 10$  micromol / l. Sulla base di vari modelli di calcolo, la riduzione di elevate concentrazioni plasmatiche di omocisteina può teoricamente prevenire fino al 25% di eventi cardiovascolari. La supplementazione è economica, potenzialmente efficace e priva di effetti avversi e, pertanto, ha un rapporto beneficio / rischio eccezionalmente favorevole. I risultati degli studi randomizzati di intervento controllato randomizzati devono essere disponibili prima dello screening e il trattamento dell'ipomocisteinemia può essere raccomandato per la popolazione generale apparentemente sana (Stanger O, et al. 2003).

La concentrazione di **vitamina C** nel sangue è inversamente correlata con i valori della pressione arteriosa e con rischio di malattia cardiovascolare nell'uomo (Borghi C, Cicero AF. 2017).

E' stato riscontrato che i soggetti ipertesi hanno livelli di ascorbato plasmatico significativamente più bassi rispetto ai soggetti normotesi (40  $\mu\text{mol l}^{-1}$  vs 57  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , rispettivamente). Uno studio sulla riduzione della deplezione della vitamina C ha anche confermato una correlazione inversa dei livelli di ascorbato plasmatico con i valori di pressione arteriosa sistolica e diastolica. In una meta-analisi di studi clinici con una dose mediana di vitamina C di 500 mg al giorno-1 su un periodo mediano di 8 settimane in pazienti ipertesi, la sistolica è stata ridotta di  $4,8 \pm 1,2$  mmHg ( $P < 0,01$ ).

La vitamina C sembra anche migliorare l'efficacia dei farmaci anti-ipertensivi come l'amlodipina. Nei pazienti anziani con ipertensione refrattaria che sono già in terapia farmacologica massimale, 600 mg di vitamina C al giorno hanno abbassato il Bpby20  $\pm 8/16 \pm 5$  mmHg.

Sono stati proposti numerosi meccanismi per spiegare la riduzione della PA indotta da vitamina C: un aumento di NO e Pgl2, che porta a un miglioramento della funzione endoteliale e della compliance arteriosa; l'induzione di Na<sup>+</sup> e diuresi dell'acqua; una diminuzione della produzione di steroidi surrenali; un aumento di Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -ATPasi; un aumento della superossido dismutasi; un aumento nella GMP ciclica; attivazione di canali di potassio; una riduzione del Ca<sup>++</sup> citosolico e una diminuzione delle aldeidi sieriche [63]. Inoltre, la vitamina C sembra diminuire l'affinità di legame del recettore dell'angiotensina II tipo 1 (AT1) per l'angiotensina II interrompendo i ponti disolfuro del recettore AT1. Le dosi di supplementi di vitamina C che vengono proposti per migliorare la pressione arteriosa (500-1000 mg al giorno 1) sono generalmente ben tollerate e non richiedono alcuna attenzione specifica. (Borghi C, Cicero AF. 2017)

Inoltre, la vitamina C ha effetti potenziali nell'alleviare lo stato infiammatorio riducendo la Proteina C reattiva, la glicemia a digiuno e IL-6 in pazienti ipertesi e / o diabetici obesi.

Recentemente (*Ellulu MS et al. 2015*) sono stati studiati sessantaquattro pazienti obesi, che erano ipertesi e / o diabetici e avevano alti livelli di marcatori infiammatori, dai centri di assistenza sanitaria di base a Gaza City, in Palestina, sono stati arruolati in uno dei due gruppi in uno studio controllato randomizzato parallelo in aperto. Un totale di 33 pazienti sono stati randomizzati in un gruppo di controllo e 31 pazienti sono stati randomizzati in un gruppo sperimentale. Il gruppo sperimentale è stato trattato con 500 mg di vitamina C due volte al giorno.

Nel gruppo sperimentale, la vitamina C ha ridotto significativamente i livelli di proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP), interleuchina 6 (IL-6), glicemia a digiuno (FBG) e trigliceridi (TG) dopo 8 settimane di trattamento (totale:  $P < 0,001$ ); nessun cambiamento è apparso nel colesterolo totale (TC). Nel gruppo di controllo, vi erano riduzioni significative di FBG e TG ( $P = 0,001$  e  $P = 0,026$ , rispettivamente), e nessuna modifica in hs-CRP, IL-6 o TC. Confrontando i cambiamenti nel gruppo sperimentale con quelli nel gruppo di controllo all'endpoint, si è scoperto che la vitamina C ha raggiunto un significato clinico nel trattamento dell'efficacia per la riduzione dei livelli di hs-CRP, IL-6 e FBG ( $P = 0,01$ ,  $P = 0,001$  e  $P < 0,001$ , rispettivamente), ma non sono stati trovati cambiamenti significativi nella TC o TG.

Tra le vitamine del gruppo B la **niacina** è senz'altro la più studiata, per la quale vi sono pure evidenze di efficacia.

I farmaci clinicamente più rilevanti per la gestione dei lipidi sono le statine, che costituiscono nella maggior parte dei casi la base di qualsiasi terapia modulante i lipidi. Tuttavia, spesso sono necessari altri agenti per ridurre il colesterolo a bassa densità ai livelli target e / o per trattare le anomalie residue della lipoproteina sierica.

La niacina (acido nicotinico o vitamina B3) è attualmente l'agente più potente disponibile per aumentare le lipoproteine ad alta densità e ridurre la lipoproteina (a), entrambi fattori di rischio indipendenti per le malattie cardiovascolari. È stato anche scoperto che la niacina riduce i marcatori infiammatori come la proteina C-reattiva (CRP) e la fosfolipasi A2 associata alla lipoproteina (Lp-PLA2) e per ridurre LDL a piccole densità e aumentare le LDL di grandi particelle, tutte potenzialmente proprietà anti-aterosclerotiche. Attraverso la sua azione sul recettore GPR109A, la niacina sembra anche esercitare vari effetti pleiotropici come il miglioramento della funzione endoteliale e la riduzione dell'infiammazione e dello stress ossidativo. Tuttavia, la niacina è spesso sottoutilizzata nel contesto clinico, principalmente a causa di effetti collaterali dose correlata, come vampate, iperglicemia e iperuricemia, rispettivamente. Sulla base della totalità delle prove esistenti, la niacina dovrebbe nel frattempo rimanere alta nella lista degli agenti che modulano i lipidi da utilizzare nella pratica clinica, in secondo luogo dopo le statine.

(Gouni- Berthold, 2013)

L'uso di formulazioni di niacina approvate dalla FDA a dosi terapeutiche, da sole o in combinazione con statine o altre terapie lipidiche, è sicuro, migliora i parametri lipidici multipli e riduce la progressione dell'aterosclerosi. La niacina è unica come la più potente terapia lipidica disponibile per aumentare il colesterolo delle lipoproteine ad alta densità (HDL) e riduce significativamente la lipoproteina (a).

Attraverso la sua azione sul recettore GPR109A, la niacina può anche esercitare benefici effetti pleiotropici indipendentemente dalle variazioni dei livelli lipidici, come il miglioramento della funzione endoteliale e l'attenuazione dell'infiammazione vascolare.

Studi che valutano l'impatto della niacina in pazienti naïve alle statine su esiti cardiovascolari, o da soli e in combinazione con statine o altre terapie lipidiche sulla progressione dell'aterosclerosi, sono stati universalmente favorevoli (Villines TC, 2012)

## Riferimenti

Baker WL, Tercius A, Anglade M, White CM, Coleman C. A meta-analysis evaluating the impact of chitosan on serum lipids in hypercholesterolemic patients. *Ann Nutr Metab.* 2009;55(4):368-74. doi: 10.1159/000258633. Epub 2009 Nov 13.

Borghi C, Cicero AF. Nutraceuticals with a clinically detectable blood pressure-lowering effect: a review of available randomized clinical trials and their meta-analyses. *Br J Clin Pharmacol.* 2017 Jan;83(1):163-171. doi: 10.1111/bcp.12902. Epub 2016 Mar 15.

Daroghegi Mofrad M. et al. Effect of magnesium supplementation on endothelial function: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 2018 Jun;273:98-105. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.020. Epub 2018 Apr 14.

Ellulu MS et al. Effect of vitamin C on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: a randomized controlled trial. *Drug Des Devel Ther.* 2015 Jul 1;9:3405-12. doi: 10.2147/DDDT.S83144. eCollection 2015.

Fratte A, Frare C, Uras G, Bonini M, Casari B, Bariani E, Ragazzo B, Gaballo P, Longobardi P, Codemo C, Paoli A. New chitosan salt in gastro-resistant oral formulation could interfere with enteric bile salts emulsion of diet fats: preliminary laboratory observations and physiologic rationale. *J Med Food.* 2014 Jun;17(6):723-9.

Gouni-Berthold, Berthold HK. The role of niacin in lipid-lowering treatment: are we aiming too high? *Curr Pharm Des.* 2013;19(17):3094-106

Guha S, Pal SK, Chatterjee N, Sarkar G, Pal S, Guha S, Basu AK, Banerjee R. Effect of chitosan on lipid levels when administered concurrently with atorvastatin--a placebo controlled study. *J Indian Med Assoc.* 2005 Aug;103(8):418, 420.

Huang H, Zou Y, Chi H, Liao D. Lipid-Modifying Effects of Chitosan Supplementation in Humans: A Pooled Analysis with Trial Sequential Analysis. *Mol Nutr Food Res.* 2018 Apr;62(8):e1700842. doi: 10.1002/mnfr.201700842. Epub 2018 Mar 15.

Jull AB, Ni Mhurchu C, Bennett DA, Dunshea-Mooij CA, Rodgers A. Chitosan for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Jul 16;(3):CD003892. doi: 10.1002/14651858.CD003892.pub3.

Kim HJ, Ahn HY, Kwak JH, Shin DY, Kwon YI, Oh CG, Lee JH. The effects of chitosan oligosaccharide (GO2KA1) supplementation on glucose control in subjects with prediabetes. *Food Funct.* 2014 Oct;5(10):2662-9. doi: 10.1039/c4fo00469h. Epub 2014 Sep 15.

Kostov K et al. Role of Magnesium Deficiency in Promoting Atherosclerosis, Endothelial Dysfunction, and Arterial Stiffening as Risk Factors for Hypertension. *Int Mol Sci* 2018 Jun 11;19(6). pii: E1724. doi: 10.3390/ijms19061724

Mhurchu CN, Dunshea-Mooij C, Bennett D, Rodgers A. Effect of chitosan on weight loss in overweight and obese individuals: a systematic review of randomized controlled trials. *Obes Rev.* 2005 Feb;6(1):35-42.

Mhurchu CN, Poppitt SD, McGill AT, Leahy FE, Bennett DA, Lin RB, Ormrod D, Ward L, Strik C, Rodgers A. The effect of the dietary supplement, Chitosan, on body weight: a randomised controlled trial in 250 overweight and obese adults. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004 Sep;28(9):1149-56.

Ministero della Salute. Allegato 1 al DM 9 luglio 2012 sulle "Sostanze e preparati vegetali ammessi" come aggiornato dal Decreto 27 marzo 2014 e "Linee guida ministeriali di riferimento per gli effetti fisiologici" aggiornate secondo il parere della Commissione Unica per la Dietetica e la Nutrizione (CUDN) del 18 dicembre 2013. Disponibile a: [www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=0&codLeg=48636&parte=2&serie=](http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=0&codLeg=48636&parte=2&serie=).

Ministero della Salute. Allegato 1 bis (attuale lista BEL- FRIT). Disponibile a: [www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=0&codLeg=48636&parte=3&serie=](http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=0&codLeg=48636&parte=3&serie=).

Ministero della Salute. Altri nutrienti e altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico. *Rev.* novembre 2017. Disponibile a: [www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pagineAree\\_1268\\_listaFile\\_itemName\\_4\\_file.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_4_file.pdf).

Ministero della Salute. Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione. Apporti giornalieri di vitamine e minerali ammessi negli integratori alimentari. *Rev.* maggio 2017. Disponibile a: [www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pagineAree\\_1268\\_listaFile\\_itemName\\_5\\_file.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_5_file.pdf).

Ministero della Salute. Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione. Linee guida sulla documentazione a supporto dell'impiego di sostanze e preparati vegetali (botanicals) negli integratori alimentari di cui al DM 9 luglio 2012. *Rev.* gennaio 2015. Disponibile a: [www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pagineAree\\_1424\\_listaFile\\_itemName\\_2\\_file.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1424_listaFile_itemName_2_file.pdf).

Ministero della Salute. Integratori alimentari e Linee guida ministeriali (LGM). Disponibile a: [www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?id=1267&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=1267&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori).

Ministero della Salute. Integratori alimentari. Disponibile a: [www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_5.jsp?lingua=italiano&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_5.jsp?lingua=italiano&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori).

Muzzarelli RA. Clinical and biochemical evaluation of chitosan for hypercholesterolemia and overweight control. *EXS.* 1999;87:293-304.

Rawal T. et al. Chitosan Nanoparticles of Gamma-Oryzanol: Formulation, Optimization, and In vivo Evaluation of Anti-hyperlipidemic Activity. *AAPS PharmSciTech* · April 2018 DOI: 10.1208/s12249-018-1001-8

Stanger O, et al. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society):

consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 2003 Nov;41(11):1392-403. Review. Erratum in: *Clin Chem Lab Med*. 2004 Jan;42(1):113-6.

Tapola NS et al. Safety Aspects and Cholesterol-Lowering Efficacy of Chitosan Tablets. *J Am Coll Nutrition*, Vol. 27, No. 1, 22–30 (2008)

Villines TC, Kim AS, Gore RS, Taylor AJ. Niacin: the evidence, clinical use, and future directions. *Curr Atheroscler Rep*. 2012 Feb;14(1):49-59

Wuolijoki E, Hirvelä T, Ylitalo P. Decrease in serum LDL cholesterol with microcrystalline chitosan. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1999 Jun;21(5):357-61.

Yang Yu, et al. Chitosan Oligosaccharides Attenuate Atherosclerosis and Decrease Non-HDL in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *J Atheroscler Thromb*, 2015; 22: 926-941.

Zong C, Yu Y, Song G, Luo T, Li L, Wang X, Qin S. Chitosan oligosaccharides promote reverse cholesterol transport and expression of scavenger receptor BI and CYP7A1 in mice. *Exp Biol Med* (Maywood). 2012 Feb;237(2):194-200. doi: 10.1258/ebm.2011.011275. Epub 2012 Feb 2.