

PROCOLO DE ESTUDIO CLINICO

INGESTION DE BELAGE®

Verificación de que BELAGE® hace destacar la actividad de dos enzimas endógenas antioxidantes principales, SOD y GPx: mejorando el estado antioxidante del cuerpo.

PROCOLO DE ESTUDIO

OR-797- 10-RF

PREPARADO POR

NINAPHARM SAS
16 Place Vendôme,
75001 PARIS - France

CENTRO QUE DESARROLLO LA INVESTIGACION

Laboratorios PROBIOX, Bélgica

PARA SER LLEVADO A CABO POR

Laboratorios PROBIOX, Bélgica
Campus Universitaire du Sart Tilman
Avenue de l'hôpital - Tour Giga B34 - 3^e Etage
4000 LIEJA - Bélgica

FECHA DE EMISION

Marzo de 2010

CONFIDENTIAL

Este documento es propiedad de PROBIOX y contiene información de patente. Ni este documento, ni la información contenida aquí debe ser reproducida ni puesta a disposición de otros, totalmente o en parte, ni usarse para ningún otro propósito que la presentación de este trabajo en representación del patrocinador sin el consentimiento previo y por escrito de PROBIOX.

BOSQUEJO DEL ESTUDIO

Título

Verificación de que BELAGE® incrementa la actividad de dos enzimas endógenas antioxidantes principales, SOD y GPx: mejorando el estatus antioxidante del cuerpo.

Investigador Principal

PROBIOX - Bélgica

Objetivos

Primario: Evaluar el beneficio potencial de un suplemento de BELAGE® en la mejora del estatus antioxidante, con SOD y GPx.

Secundario: Evaluar el beneficio potencial de un suplemento de BELAGE® en la reducción de la peroxidación de los lípidos y de la oxidación de LDL.

Hipótesis del Estudio: El suplemento de BELAGE®

- Mejora el estatus antioxidante y los niveles de SOD, GPx,
- Reduce la peroxidación de los lípidos y la oxidación de LDL.

Salidas

Primaria

Niveles de suero SOD (determinados espectrofotométricamente a 480 nm)

La actividad GPx fue ensayada espectrofotométricamente en equipos comerciales de eritrocitos.

Las unidades de actividad GPx fueron calculadas siguiendo la oxidación NADPH a 340 nm usando hidroperóxido de cumeno como sustrato.

Secundario

La actividad de peroxidación de los lípidos (POOL) fue determinada estimando la acumulación de los productos de peroxidación, sustancias ácido-reativas tiobarbitúricas (TBARS) (Ohkawa y otros, 1979).

Oxidación LDL: La OxLDL se determinó usando un equipo ELISA comercialmente disponible (Biomedica, Viena, Austria).

Diseño

Este es un análisis clínico, llevado a cabo por un solo centro.

Consideraciones del tamaño de muestra

Treinta adultos se enrolarán para participar en el estudio sobre un período de tratamiento de 30 días.

Plan de análisis estadístico

Basado en un principio de modelos lineales para resultados continuos y pruebas de Chi-cuadrada/Fisher y en principios de regresión logística para resultados discretos.

Descripción de sujetos de prueba y criterios principales para su inclusión

Hombres y mujeres saludables, no sujetos a tratamientos médicos, no fumadores, entre 25 y 60 años, con peso por altura corporal saludable (BMI entre 19 a 30).

Descripción de los Principales Criterios de Exclusión

BMI menor que 19 ó BMI más grande que 30

Fumadores (una prueba de orina se llevará a cabo para determinar si hay Nicotina presente)

No sujetos a tratamiento médico (Se proporcionarán los criterios. Ver los criterios de inclusión)

Daño del ADN

Enfermedades Malignas (Incluyendo diagnóstico de cáncer, leucemia, etc.)

Enfermedades Inflamatorias

Indicación de altos niveles oxidativos

Productos a ser probados:

BELAGE®

250 mg por día - durante el día - por un periodo de tratamiento de 30 días.

Plan de estudio	D0	D30
Datos de Historia/sujeto	X	
Consentimiento informado firmado	X	
Examen Clínico	X	
Extracción de sangre en ayunas	X	
Formulación del suplemento	X	->
Evento adverso		X

Introducción

El olivo (*Olea europaea*) y el romero (*Rosemary officinalis*) son especies vegetales ricas en compuestos fenólicos que desarrollan una fuerte actividad antioxidante y que también han sido parte de la dieta Mediterránea durante siglos.

BELAGE® contiene extractos de olivo y romero, cuyo contenido antioxidante presente en la dieta humana, entre otros factores, ha sido relacionado con la prevención de enfermedades de la arteria coronaria y de la arterioesclerosis.

Además, el hidroxitirosol y la oleuropeina de los olivos han venido siendo señaladas como potentes eliminadores de radicales libres.

Este estudio publica los resultados de una prueba clínica con **BELAGE®**, ingerido oralmente, que prueba los poderosos atributos antioxidantes de este extracto.

Las siguientes secciones muestran que la capacidad de un tratamiento de 30 días con un suplemento de **BELAGE®** estimula enzimas antioxidantes que juegan un papel crucial en la protección de las células evitándoles ser dañadas por los radicales libres.

Las enzimas antioxidantes tales como el superóxido dismutasa o el glutatión peroxidasa catalizan las reacciones de enfriamiento repentino de los radicales libres, previniendo así el stress oxidativo.

Este estudio demuestra que **BELAGE®** incrementa la actividad de las dos principales enzimas endógenas antioxidantes, SOD y GPx: mejorando las defensas antioxidantes.

Más aún, el mismo tratamiento dio por resultado reducciones significativas de los niveles de peroxidación de los lípidos y de la oxLDL: que también mostraron menos formación de radicales libres.

Capacidad Antioxidante de BELAGE®

La producción excesiva de radicales libres tales como el radical aniónico del superóxido, el radical hidroxilo y el radical alquilperoxilo, inducen un daño oxidativo en las células.

Se propone que el daño está asociado con un síndrome metabólico, con el envejecimiento, con el cáncer, con la arteriosclerosis y con otras enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

En contraste, los antioxidantes, como atacantes y eliminadores de los radicales libres e inhibidores de la peroxidación de los lípidos, se les asignan papeles importantes en la prevención de tales enfermedades.

Así pues, los antioxidantes son actualmente el tópico más atractivo para la investigación debido a su papel en la salud humana.

Han sido publicados muchos artículos reportando el efecto neuroprotector y la protección vascular de las frutas y vegetales, conectadas a la dieta Mediterránea: apoyando la hipótesis de que los antioxidantes incluidos en la dieta y los compuestos anti-inflamatorios pueden ejercer un efecto neuroprotector directo.

Durante los últimos pocos años, la evidencia que ha emergido hace pensar que los flavonoides de la dieta (representando un amplio rango de compuestos polifenólicos) que acompañan naturalmente a algunas plantas y alimentos pueden ejercer efectos benéficos sobre el sistema nervioso central debido a su eficacia en la protección de las neuronas contra las lesiones inducidas por el stress oxidante, suprimiendo la neuroinflamación y por ende, una mejora en el control de los factores de riesgo cardiovascular.

El olivo (*Olea europaea*) y el romero (*Rosemary officinalis*) son especies vegetales ricas en compuestos fenólicos que conllevan una fuerte actividad antioxidante y también han sido parte de la dieta Mediterránea durante siglos.

El hidroxitirosol y la oleuropeina de los olivos, han demostrado ser potentes destructores de los radicales.

Además de todo, su presencia en la dieta humana, entre otros factores, ha sido relacionada con la prevención de enfermedades de las arterias coronarias y de la arterioesclerosis.

Hay varios reportes que identifican los compuestos que son primariamente responsables de las propiedades antioxidantes de los extractos de romero tanto en fracciones lipofílicas como hidrofílicas (4, 5).

La actividad antioxidante de estos extractos se debe principalmente al contenido de diterpenos abietano fenólicos (ácido carnósico y sus productos secundarios derivados tales como carnosol, rosmadial, rosmanol, isómeros del rosmanol y el metil carnosato.

Más aún, la ocurrencia de otros compuestos fenólicos tales como los flavonoides y los ácidos fenólicos, especialmente el ácido rosemarínico, también contribuyen a la bioactividad de **BELAGE®**.

El **Romero (*Rosmarinus officinalis L.*)** es una planta medicinal y aromática muy importante, que pertenece a la familia de las *Lamiaceae* y ha sido cultivada desde tiempos ancestrales.

Los antropólogos y los arqueólogos han encontrado evidencia de que las hierbas de romero fueron usadas como medicinales y por sus virtudes culinarias y cosméticas en el antiguo Egipto, Mesopotamia, China e India.

Su difusión tan grande como una hierba culinaria así como los estudios experimentales, han probado que su uso es seguro.

Las hojas del *Rosmarinus officinalis* poseen una variedad de agentes bioactivos, que incluyen antioxidantes anti-tumorales y anti-inflamatorios.

Los principales constituyentes relevantes están formados por una vasta cantidad de compuestos polifenólicos, incluyendo el ácido carnósico, el carnosol, el ácido rosemarínico, el ácido ursólico, etc.

Entre estos, el ácido carnósico (CA) (un compuesto de diterpeno fenólico) y el carnosol son los constituyentes antioxidantes más poderosos (cerca del 90% de la actividad antioxidante).

Posadas y otros investigadores (12) también mostraron que suplementando la dieta de ratas viejas con extracto de romero, 20% CA, produjo actividad de la enzima antioxidante, una reducción en la peroxidación de los lípidos y en los niveles de ROS que fue significativa para la actividad catalasa en el corazón y el cerebro, NOS en el corazón y en los niveles de LPO y ROS en diferentes tejidos cerebrales.

Abundando, el CA tiene una actividad antimicrobiana, puede inhibir la absorción de los lípidos en animales y reducir la ganancia de peso corporal en animales y es un enemigo natural de los radicales libres, debido a su esqueleto fenólico.

Asimismo, la modulación del stress oxidativo causada por el *Rosmarinus officinalis* ha sido demostrada en ratas a las que se les indujo cirrosis en el hígado mediante CCl₄.

Los **olivos (*Olea europaea L.*)** han sido ampliamente usados en remedios tradicionales en países Europeos y Mediterráneos tales como Grecia, España, Italia, Francia.

Se han usado en la dieta humana como extractos o polvos y contienen muchos compuestos potencialmente bioactivos que pudieran tener propiedades antioxidantes, antihipertensivas, antiaterogénicas, anti-inflamatorias, hipoglucémicas e hipocolesterolémicas.

Los olivos del tipo *Olea europaea* son ricos en biofenoles de la oliva, tales como la oleuropeina, la verbascosida, la ligstrosida, el tirosol y el hidroxitirosol.

Uno de estos compuestos potencialmente bioactivos es la oleuropeina secoiridoide (OLE) que puede constituir hasta un 6-9% de la materia seca de las hojas.

Este compuesto es un glucosido secoiridoide fenólico con una sustitución hidroxiaromática.

Algunos de estos biofenoles han mostrado una gran variedad de actividades biológicas tales como las propiedades antioxidantes o antimicrobianas.

En 2007, los investigadores en Australia que estudiaban la capacidad antioxidante de 55 hierbas medicinales, frutas y vegetales encontraron que el extracto de oliva tenía la más alta actividad para atacar y disolver radicales - más del doble que la del *Camellia sinensis* (te verde).

Las propiedades antioxidantes de los polifenoles de la oliva han sido estudiadas extensamente y sus efectos se describen en numerosas revistas y artículos de investigación.

Se han llevado a cabo muchos experimentos *in vitro* y con animales para demostrar la actividad antioxidante de los extractos de la oliva y la de sus principales compuestos activos, la oleuropeina y el hidroxitirosol.

La oleuropeina ha demostrado que reduce la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés) tanto *in vitro* como en conejos.

En las células epiteliales de ratas estimuladas con citocinas, un extracto concentrado de polifenol redujo la concentración de nitrito y la producción de radicales libres.

Los conejos con diabetes inducida mostraron una disminución en los indicadores del stress oxidativo cuando fueron tratados con oleuropeina.

La biodisponibilidad de los polifenoles de la oliva también ha sido estudiada en seres humanos y se ha correlacionado a su eficacia antioxidante.

Los resultados de este estudio indican que los polifenoles de la oliva poseen buena biodisponibilidad, lo que coincide con su eficacia antioxidante.

La revisión de los estudios de la intervención humana mostró que los polifenoles de la oliva disminuyeron los niveles de la LDL oxidada en el plasma y afectaron positivamente varios bioindicadores del daño oxidativo.

Los efectos antioxidantes de los polifenoles de la oliva sobre la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) son observados después de una ingesta en la dieta de alrededor de 10 mg por día.

La evidencia global de los ensayos *in vitro* y los estudios en humanos y animales apoyan el efecto antioxidante de los polifenoles de la oliva.

Adicionalmente, el olivo y la oleuropeina han estado relacionadas con la prevención de enfermedades de la arteria coronaria y de la arterioesclerosis debido a su habilidad para inhibir el agregado de plaquetas, para modular el metabolismo del ácido araquidónico, para inhibir la peroxidación de las LDL y para reducir el colesterol en la sangre.

Estas respuestas a la suplementación del extracto de olivo son consistentes con las respuestas farmacológicas reportadas tanto para la oleuropeina como para su principio metabolito colónico, el hidroxitirosol.

Las respuestas más encaminadas hacia la cardioprotección incluyen efectos anti-inflamatorios, inhibición de los agregados de plaquetas y la producción de tromboxano [A. sub. 2] y la protección contra las lesiones oxidativas del miocardio inducidas por isquemia and reperfusión.

Referencias

- 1) Anadon, A. y otros, *Acute oral safety study of rosemary extracts in rats*, J Food Prot, 2008, **71**(4): p. 790-5.
- 2) Aruoma, O. I. y otros, *An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs*, Food Chem Toxicol, 1996, **34**(5): p. 449-56.
- 3) Ramirez, P. y otros, *Separation of rosemary antioxidant compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns*, J Chromatogr A, 2004, **1057**(1-2): p. 241-5.
- 4) Singletary, K., MacDonald, C., and Wallig, M., *Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation*, Cancer Lett, 1996, **104**(1): p. 43-8.
- 5) al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., and Sen, P., *Pharmacology of rosemary (Rosmarinus officinalis Linn.) and its therapeutic potentials*, Indian J Exp Biol, 1999, **37**(2): p. 124-30.
- 6) Chan, M. M., Ho, C., and Huang, H. I., *Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production*, Cancer Lett, 1995, **96**(1): p. 23-9.
- 7) Altinier, G. y otros, *Characterization of topical antiinflammatory compounds in Rosmarinus officinalis L*, J Agric Food Chem, 2007, **55**(5): p. 1718-23.
- 8) Ramirez, P., Garcia-Risco, M. R., Santoyo, S., Seronans, F. J., Ibañez, E., Reglero, G., *Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative supercritical fluid (Prep-SFC)*, J. Pharm. Biomed. Anal, 2006, **41**: p. 1606-1613.
- 9) Senorans, F. J. y otros, *Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants*, J Chromatogr A, 2000, **870**(1-2): p. 491-9.
- 10) Richeimer, S. L. y otros, *Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary*, J Am Oil Chem Soc, 1996, **73**(4): p. 507-514.
- 11) Masuda, T., Inaba, Y., and Takeda, Y., *Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products*, J Agric Food Chem, 2001, **49**(11): p. 5560-5.
- 12) Posadas, S. J. y otros, *Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, Rosmarinus officinalis, on antioxidants of major organs of aged rats*, Exp Gerontol, 2009, **44**(6-7): p. 383-9.
- 13) Del Campo, J., Amiot, M. J., and Nguyen, C., *Antimicrobial effect of rosemary extracts*, J Food Prot, 2000, **63**(10): p. 1359-68.
- 14) Oluwatuyi, M., Kaatz, G. W., and Gibbons, S., *Antibacterial and resistance modifying activity of Rosmarinus officinalis*, Phytochemistry, 2004, **65**(24): p. 3249-54.
- 15) Ninomiya, K. y otros, *Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage*, Bioorg Med Chem Lett, 2004, **14**(8): p. 1943-6.
- 16) del Baño, M. J. y otros, *Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of Rosmarinus officinalis. Antioxidant activity*, J Agric Food Chem, 2003, **51**(15): p. 4247-53.
- 17) Masuda, T. y otros, *Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant*, J Agric Food Chem, 2002, **50**(21): p. 5863-9.

- 18) Gutierrez, R. y otros, *Oxidative stress modulation by Rosmarinus officinalis in CCl4-induced liver cirrhosis*, *Phytother Res*, 2010, **24**(4): p. 595-601.
- 19) Takahashi, T. y otros, *Carnosic acid and carnosol inhibit adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 cells through induction of phase2 enzymes and activation of glutathione metabolism*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **382**(3): p. 549-54.
- 20) Benavente-García, O. y otros, *Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L.*, *Food Chemistry*, 2000, **68**: p. 457-462.
- 21) Aziz, N. H. y otros, *Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds*, *Microbios*, 1998, **93**(374): p. 43-54.
- 22) Bisignano, G. y otros, *On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol*, *J Pharm Pharmacol*, 1999, **51**: p. 971-4.
- 23) Tripoli, E. y otros, *The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health*, *Nutr Res Rev*, 2005, **18**(1): p. 98-112.
- 24) Visioli, F., Poli, A., and Gall, C., *Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil*, *Med Res Rev*, 2002, **22**(1): p. 65-75.
- 25) Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Rio, J. A., *Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L.*, *Food Chem.*, 2000, **68**: p. 457-462.
- 26) Saija, A., Uccella, N., *Olive biophenols: functional effects on human wellbeing*, *TIFS* 2001, **11**: p. 357-363.
- 27) Visioli, F., Bellomo, G., and Galli, C., *Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols*, *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **247**(1): p. 60-4.
- 28) Saija, A. y otros, *"In vitro" evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol*, *Int J Pharm*, 1998, **166**: p. 123-33.
- 29) Gordon, M. H., Paiva-Martins F. y Almeida M., *Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols*, *J Agric Food Chem*, 2001, **49**(5): p. 2480-5.
- 30) Briante, R. y otros, *Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic beta-glycosidase*, *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(7): p. 3198-203.
- 31) Saija, A. y Uccella N., *Olive biophenols: functional effects on human wellbeing*, *TIFS*, 2001, **11**: p. 357-363.
- 32) Paiva-Martins, F., Gordon, M. H. y Gameiro P., *Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes*, *Chem Phys Lipids*, 2003, **124**(1): p. 23-36.
- 33) Visioli, F. y otros, *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents*, *Atherosclerosis*, 1995, **117**(1): p. 25-32.
- 34) Visioli, F. y Galli C., *Biological properties of olive oil phytochemicals*, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2002, **42**(3): p. 209-21.
- 35) Zaslaver, M., Offer, S., Kerem, Z., Stark, A. H., Weller, J. I., Eliraz y otros, *Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells*, *J Agric. Food Chem.*, 2005, **53**: p. 9934-9.

- 36) Kountouri, M.A., Kaliora, A. C., Andrikopoulos, N. K., *Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of Olea europaea (olives): impact on plasma antioxidant status in humans*, *Phytomedicine*, 2007, **14**(10): p. 659-667.
- 37) Raederstorff, D., *Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review*, *Int J Vitam Nutr Res*, 2009, **79**(3): p. 152-65.
- 38) Carluccio, M. A. y otros, *Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**(4): p. 622-9.
- 39) Kohyama, N. y otros, *Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol, a phenolic compound from olives*, *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, **61**(2): p.347-50.
- 40) Andreadou, I. y otros, *The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits*, *J Nutr*, 2006, **136**(8): p. 2213-9.
- 41) Khayyal, M. T. y otros, *Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (Olea europaea) in L-NAME induced hypertension in rats*, *Arzneimittelforschung*, 2002, **52**(11): p. 797-802.
- 42) Lasserre, B. y otros, *Effects on rats of aqueous extracts of plants used in folk medicine as antihypertensive agents*, *Naturwissenschaften*, 1983, **70**(2): p. 95-6.
- 43) Soler-Rivas, E. J., Wichers, H. J., *Oleuropein and related compounds*, *J Sci Food Agric*, 2000, **80**: p. 1013-23.
- 44) Corona, G. y otros, *The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation*, *Free Radic Res*, 2006, **40**(6): p. 647-58.
- 45) Manna, C. y otros, *Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion*, *J Nutr Biochem*, 2004, **15**(8): p. 461-6.
- 46) Pieroni, H. D., Pieters L. y otros, *In vitro anticomplementary activity of flavonoids from olive (Olea europaea L.) leaves*, *Pharmazie*, 1996, **51**: p. 765-768.
- 47) Petroni, B. M., Salami, M. y otros, *Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil*, *Thromb Res*, 1995, **78**(151-160).
- 48) Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., and Nucci, R., *Olea europaea L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties*, *J Agric Food Chem Toxicol*, 2002, **50**: p. 4934-4940.
- 49) Petkov, V. and Manolov, P., *Pharmacological analysis of the iridoid oleuropein*.