

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA



Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA IN TERAPIE AVANZATE MEDICO

CHIRURGICHE

Direttore: Prof. Giovanni Di Minno

TESI DI DOTTORATO

“IMPATTO DI ALIMENTI FUNZIONALI DI ORIGINE VEGETALE SUL

METABOLISMO GLICO-LIPIDICO NELL’UOMO”

RELATORE

Ch.mo Prof.

Gabriele Riccardi

CANDIDATO

Dott.ssa Claudia Vetrani

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

Indice

1. Introduzione	pag.1
2. Composti funzionali di origine vegetale	pag.2
2.1. Fibra alimentare	pag.3
2.1.1. Definizione e classificazione	pag.3
2.1.2. Effetti della fibra sul metabolismo glico-lipidico	pag.4
2.1.3. Amido resistente	pag.6
2.1.3a. Definizione e classificazione	pag.6
2.1.3b. Effetti dell'amido resistente sul metabolismo glico-lipidico	pag.9
2.2. Polifenoli	pag.10
2.2.1. Definizione, struttura e classificazione	pag.10
2.2.1a. Acidi fenolici	pag.10
2.2.1b. Alcoli fenolici	pag.11
2.2.1c. Stilbeni	pag.12
2.2.1d. Lignani	pag.12
2.2.1e. Flavonoidi	pag.12
2.2.2. Biodisponibilità e metabolismo	pag.17
2.2.3. Effetti dei polifenoli sul metabolismo glico-lipidico	pag.19
3. Adesione alle raccomandazioni nutrizionali per il consumo di alimenti di origine vegetale	pag.21
4. Alimenti funzionali	pag.22
5. Scopo e linee di ricerca	pag.29
6. Protocolli sperimentali	pag.30
6.1. Progetto HEALTHGRAIN	pag.30
6.2. Progetto ETHERPATHS	pag.45
6.3. Progetto AMILOSIO	pag.66
7. Conclusioni e prospettive future	pag.81
8. Bibliografia	pag.84
9. Pubblicazioni	pag.102

1. Introduzione

Nel corso degli anni, le numerose evidenze scientifiche sulla relazione esistente fra nutrizione e malattie croniche invalidanti hanno indotto i ricercatori a focalizzare l'interesse verso modelli alimentari o componenti della dieta capaci di prevenire e sostenere un buono stato di salute.

I risultati di diversi studi epidemiologici e di intervento indicano che il consumo di alimenti o bevande ricchi in composti bioattivi di origine vegetale, quali cereali integrali, legumi, frutta, vegetali, frutta secca, caffè e tè, è strettamente associato alla riduzione del rischio di sviluppare diabete mellito, malattie cardiovascolari e alcuni tipi di neoplasie.[1-3] Al contrario, il consumo di bevande zuccherate, carne rossa, grassi saturi e trans, si associa ad un aumento di tale rischio.[4,5]

Tali associazioni sono riconducibili ai diversi effetti degli alimenti e dei loro componenti bioattivi nella modulazione dei processi fisiopatologici implicati nell'eziopatogenesi delle malattie cronic-degenerative.

In particolare, è noto che le alterazioni delle concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina e trigliceridi, a digiuno e in fase postprandiale, e la riduzione dei livelli di colesterolo-HDL rappresentato dei fattori di rischio indipendenti per le malattie cardiovascolari non solo nei pazienti diabetici, ma anche in soggetti con pre-diabete (soggetti con alterata glicemia a digiuno o dopo due ore) e normoglicemici.[6-9]

I risultati di una meta-analisi di studi prospettici hanno mostrato che le concentrazioni di glucosio post-carico orale di glucosio rappresentano un migliore predittore di rischio cardiovascolare rispetto ai valori glicemici a digiuno.[10] Infatti, durante il digiuno, la glicemia è piuttosto costante mentre nel periodo postprandiale si verificano fluttuazioni rilevanti della glicemia che possono permanere anche diverse ore. Inoltre, un'elevata risposta glicemica postprandiale, anche se all'interno di un *range* di normalità, induce un

innalzamento repentino delle concentrazione di insulina ma anche un aumento dei lipidi plasmatici, che contribuiscono allo sviluppo della disfunzione endoteliale, il *primum movens* del danno vascolare che precede la formazione di placca aterosclerotica. Dal momento che gli esseri umani consumano almeno tre pasti al giorno, trascorrono un lungo lasso di tempo nel periodo postprandiale.[11] Pertanto, al fine di ridurre il rischio di malattie cardiometaboliche numerosi sforzi sono stati rivolti alla comprensione dei fattori della dieta che possano influenzare positivamente il metabolismo glico-lipidico dopo i pasti.

2. Composti funzionali di origine vegetale

I composti funzionali di origine vegetale rappresentano una grande varietà di molecole, comunemente assunte con la dieta, in grado di modulare numerose attività biologiche e importanti funzioni dell'organismo; pertanto, possono influenzare positivamente la salute e contribuire alla prevenzione di malattie.

In particolare, negli ultimi anni, un numero crescente di studi epidemiologici e di intervento hanno mostrato gli effetti protettivi dei composti funzionali di origine vegetale su importanti patologie, come le malattie cardiovascolari, il cancro, l'osteoporosi, il diabete mellito.[12,13]

Tra i vari componenti funzionali della dieta che potrebbero esercitare questo effetto, la fibra alimentare e, ancora più recentemente, i polifenoli, hanno suscitato molto interesse. Tuttavia, soprattutto per i polifenoli, non sono ancora del tutto chiari i meccanismi attraverso i quali essi potrebbero svolgere il loro effetto benefico.

2.1. Fibra alimentare

2.1.1. Definizione e classificazione

La fibra alimentare è costituita dalle parti edibili dei vegetali che sfuggono alla digestione nell'intestino tenue dell'uomo e transitano integre nell'intestino crasso. Essa include i polisaccaridi non amilacei (cellulosa, emicellulosa, gomme, pectine), gli oligosaccaridi (inulina, frutto-oligosaccaridi) e la lignina.

Da un punto di vista funzionale, la fibra alimentare può essere suddivisa in 4 classi:

1. fibra insolubile, poco fermentescibile (crusca). Fibra non solubile in acqua scarsamente fermentata a livello intestinale; può avere un effetto lassativo di tipo meccanico;
2. fibra solubile, non viscosa, che fermenta rapidamente (inulina, destrina, oligosaccaridi, amido resistente). Fibra solubile in acqua che non determina nessun aumento di viscosità; rapidamente e completamente fermentata dal microbiota intestinale. Può avere un effetto prebiotico ma non ha effetto lassativo;
3. fibra solubile viscosa, che fermenta rapidamente (β -glucano, gomma guar, pectina). Forma un gel viscoso in acqua che aumenta la viscosità del chimo rallentando, di conseguenza, l'assorbimento dei nutrienti. Inoltre, viene fermentata rapidamente a livello intestinale, perdendo così l'effetto lassativo;
4. fibra solubile viscosa non fermentescibile (*psyllium*, metilcellulosa). Riduce l'assorbimento dei nutrienti grazie alla sua viscosità e può avere un effetto lassativo.[14]

2.1.2. Effetti della fibra sul metabolismo glico-lipidico

Numerosi studi prospettici hanno evidenziato l'associazione inversa tra l'assunzione di fibra e il rischio cardiovascolare. Un'importante metanalisi di dieci studi di coorte (n = 2506581 in USA e Europa) [15] ha mostrato che il consumo di fibra è inversamente associato a rischio di malattia coronarica. In particolare, è stata osservata una riduzione del rischio del 14% per ogni incremento di 10g/die di *intake* di fibra, in particolare quella contenuta in frutta e cereali integrali. Più recentemente, nella coorte NIH-AARP [16], il quintile più alto di *intake* di fibra (28g /die) era associato ad un minore rischio di morte per malattie cardiovascolari rispetto al quintile di consumo più basso (12g/die). Inoltre, i risultati della *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) [17] hanno mostrato l'associazione tra elevata assunzione di fibra e bassa prevalenza di fattori di rischio cardiometabolici (sindrome metabolica, infiammazione e obesità).

Di conseguenza, le linee guida basate sulle evidenze delle principali società scientifiche nazionali ed internazionali, raccomandano una dose giornaliera di fibre tra 25-30g, preferendo cibi ricchi in fibre come frutta, verdura, cereali integrali, legumi e frutta secca.[18-20]

Per quanto riguarda l'effetto del consumo di fibra sui fattori di rischio cardiometabolico, numerosi studi hanno mostrato che il consumo abituale di fibra si associa ad un migliore controllo del peso corporeo, anche a lungo termine.[21,22] Un'importante revisione sistematica della letteratura scientifica sul tema [23], ha riassunto le evidenze sull'effetto dei diversi tipi di fibra sul peso corporeo, l'appetito e l'*intake* di energia. Le principali conclusioni di tale revisione erano che le fibre più viscosi, in particolare i β -glucani, influenzano l'appetito e l'assunzione energetica in acuto, mentre non è stata osservata una chiara associazione tra il tipo di fibra e il controllo del peso corporeo a lungo termine.

Gli alimenti ricchi in fibra sono spesso caratterizzati da un indice glicemico inferiore (GI) rispetto ad altri alimenti. Questa caratteristica evita l'aumento troppo repentino dei valori

glicemici nel periodo postprandiale, inducendo effetti benefici sulla tolleranza glicidica sia nei pazienti diabetici che in quelli non diabetici.[24]

Tra le fibre, il β -glucano (4g) di avena o orzo sembra avere il maggior effetto sul controllo glicemico [25]; tuttavia, vi sono evidenze che altre fonti di fibra possono influenzare l'omeostasi glicemica. In particolare, un'elevata assunzione di frutta, verdura, legumi e cereali integrali ha dimostrato di ridurre significativamente la glicemia postprandiale, l'insulinemia e la variabilità glicemica.[26]

Inoltre, una riduzione significativa delle concentrazioni di insulina plasmatica nel periodo postprandiale è stata osservata dopo il consumo per 12 settimane di prodotti a base di frumento integrale.[27]

Per quanto riguarda l'effetto del consumo di fibra sui lipidi plasmatici, una meta-analisi di studi controllati randomizzati ha dimostrato chiaramente che il consumo di legumi riduce il colesterolo totale e il colesterolo LDL (-11,8 mg/dl e -8,0 mg/l rispettivamente).[28]

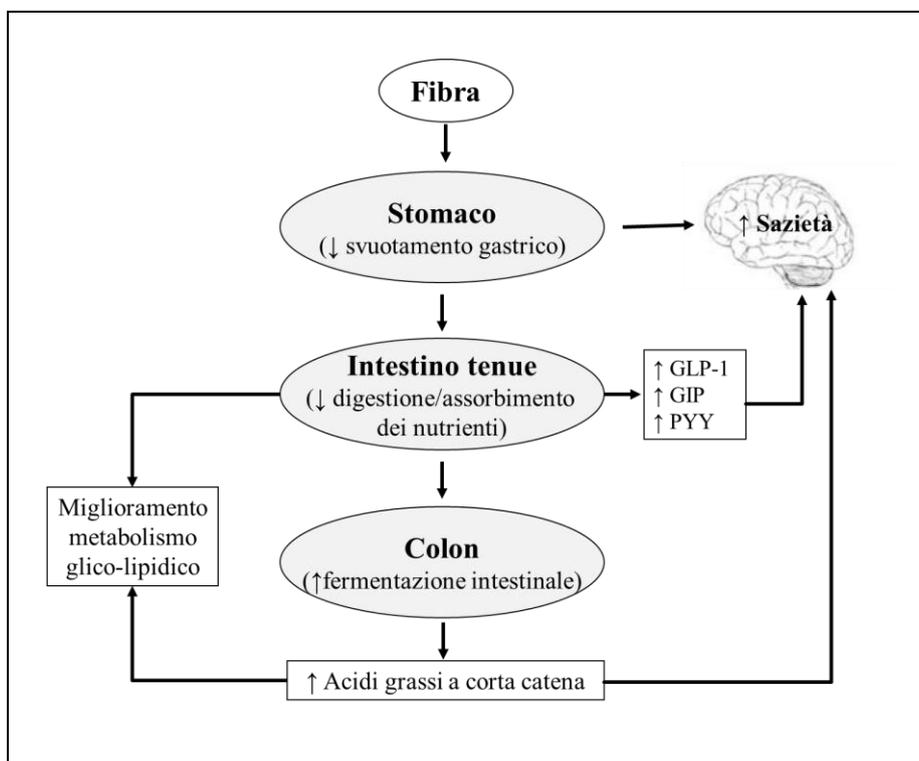
È interessante notare che questo effetto è stato ottenuto anche con altre fonti di fibre (cereali integrali, frutta e verdura) in soggetti sani [29] e in pazienti diabetici.[26,30]

L'effetto della fibra sulle concentrazioni dei trigliceridi plasmatici non ha ancora ricevuto dimostrazioni convincenti anche se è stato osservata una riduzione dei livelli plasmatici di trigliceridi nel periodo postprandiale dopo il consumo di fibra di avena o di frumento.[31]

I principali meccanismi alla base di questi effetti benefici della fibra alimentare sono riassunti in figura 1. Il consumo di fibra induce effetti metabolici grazie alla viscosità e alla struttura fisica che conferisce all'alimento in cui è contenuta, rallentando la digestione e l'assorbimento dei carboidrati e quindi riducendo l'incremento della glicemia nel periodo postprandiale ed evitando la caduta della glicemia a distanza dal pasto. Un altro effetto benefico della fibra è quello di favorire la crescita di ceppi batterici saprofiti a livello intestinale in grado di fermentare i carboidrati non digeriti con produzione di acidi grassi a

catena corta (acetico, propionico e butirrico) che sono in grado di modulare il metabolismo glico-lipidico.[32,33]

Figura 1. Potenziali meccanismi d’azione della fibra (modificata da [32])



2.1.3 Amido resistente

2.1.3a Definizione e classificazione

L'amido resistente rappresenta “la parte di amido che resiste al processo di digestione (idrolisi) da parte degli enzimi digestivi dell'intestino tenue [34], e arriva integro nell'intestino crasso, dove può essere o meno fermentato da parte del microbiota intestinale”. Tradizionalmente, l’amido resistente è classificato in cinque gruppi [35]:

- RS-I. Amido fisicamente incluso nella struttura degli alimenti, e pertanto, fisicamente inaccessibile agli enzimi digestivi. L’amido RS-I è contenuto

soprattutto nelle cariossidi dei cereali non macinati e non cotti, o nei legumi interi e crudi.

- RS-II. Amido in forma nativa, ovvero nella sua forma cristallina, che risulta difficilmente attaccabile dagli enzimi digestivi. E' contenuto nel mais e nei tuberi crudi, ma anche nelle castagne, o nelle banane non mature.
- RS-III. Amido retrogradato che si forma a seguito della gelatinizzazione seguita da raffreddamento; è tipico di pane, pasta e riso cotti e poi raffreddati ma anche di *cornflakes*, nei fiocchi di avena, biscotti e gallette di cereali, e in generale di tutti i prodotti da forno cotti e poi consumati a temperatura ambiente.
- RS-IV. Amido modificato da processi chimici o fisici, per esterificazione o eterificazione, o per la formazione di legami crociati (*cross-links*), prodotto da processi industriali per utilizzi di vario genere.
- RS-V. Amido che interagisce con i lipidi formando complessi elicoidali con acidi grassi e alcoli grassi. Il complesso amilosio-lipidi è determinato da una reazione immediata dopo la cottura.

Negli anni, sono stati sviluppati diversi metodi per facilitare l'assunzione di amido resistente nella dieta. Tali strategie possono essere classificate in strategie tradizionali e strategie di miglioramento genetico.[36]

Le strategie tradizionali comprendono:

- Selezione di alimenti che sono naturalmente ricchi di amido resistente. E' noto che alimenti come le patate, riso, pasta, cereali per la colazione e il pane sono caratterizzati da un basso contenuto di amido resistente (<2,5%, sostanza secca). Al contrario, legumi cotti e cereali integrali hanno un alto contenuto di amido resistente (5-15%, sostanza secca).
- Processi tecnologici (effetto della temperatura). Le caratteristiche strutturali dell'amido influenzano la capacità dei prodotti amidacei di sviluppare amido

resistente. In particolare, il rapporto amilosio/amilopectina influisce sulla capacità dell'amido di retrogradarsi. Il riscaldamento dell'amido in presenza di adeguati volumi di acqua contribuisce ad aumentarne il grado di gelatinizzazione e ne aumenta la digeribilità. Tuttavia, con il raffreddamento, l'amido ad alto contenuto di amilosio subisce la retrogradazione e, di conseguenza, si formano delle regioni cristalline non accessibili all'idrolisi enzimatica.

Invece, le strategie di miglioramento genetico si dividono in:

- convenzionali. Hanno il limite di non poter prescindere dall'incrocio sessuale seguito da una fase di selezione per le caratteristiche desiderate. Con lo sviluppo delle biotecnologie ad oggi sono a disposizione mezzi per superare i limiti del miglioramento genetico tradizionale. I metodi convenzionali oggi impiegati per superare la barriera sessuale comprendono sia le colture *in vitro* sia la mutagenesi (che prevede l'irradiazioni di vaste popolazioni vegetali con raggi X, raggi gamma, neutroni lenti e veloci o mediante trattamenti chimici, per poi selezionare quegli individui che presentano caratteristiche migliori).[37,38] In particolare, recentemente è stata sviluppata una nuova tecnica di mutagenesi denominata TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genomes*), una mutagenesi chimica preceduta da uno screening del DNA che permette di identificare mutazioni di uno specifico gene target.[36]
- non convenzionali. Utilizzano le biotecnologie del DNA ricombinante che permette di isolare dei brevi segmenti di tale molecola, per moltiplicarli, studiarne la sequenza nucleotidica, trasferirli nel genoma di altre cellule, controllandone l'incorporazione e l'espressione. Le metodologie principali utilizzate per trasferire geni di interesse sono il bombardamento mediante metodo biolistico, la trasformazione con *l'Agrobacterium tumefaciens*, la microiniezione, la trasformazione di protoplasti e l'elettroporazione.[36]

2.1.3b Effetti dell'amido resistente sul metabolismo glico-lipidico

Dal punto di vista nutrizionale, l'amido resistente è considerato una fibra alimentare e, pertanto, potrebbe avere le stesse proprietà funzionali benefiche descritte per le altre fibre vegetali (ovviamente, quelle non viscosi). In particolare, l'amido resistente sfuggendo alla digestione e all'assorbimento intestinale e, arrivando intatto nel colon, può essere fermentato dal microbiota intestinale con la produzione di acidi grassi a corta catena (acetato, propionato, butirato) che sono coinvolti nel miglioramento della sensibilità insulinica e del metabolismo lipidico. Inoltre, l'amido resistente aumenta il senso di sazietà inducendo una riduzione dell'introito energetico che favorisce il mantenimento di un peso corporeo adeguato.[39,40]

Questi effetti sono fortemente legati in primo luogo alla natura della matrice nel quale il granulo di amido è inserito. Infatti, notevole importanza rivestono la durezza delle cariossidi (*hardness*), la distribuzione e la forma dei granuli e la presenza di lipidi endogeni.[41] Inoltre, rivestono un ruolo fondamentale anche le proporzioni relative delle due subunità che compongono l'amido: l'amilosio e l'amilopectina. Infatti, fisiologicamente, nell'amido l'amilosio e l'amilopectina si trovano in un rapporto 1:3.

Nel duodeno, l'amilosio è digerito lentamente dall' α -amilasi, l'enzima deputato alla scissione dei legami tra le subunità di glucosio presenti nella struttura chimica dei polimeri. Al contrario, l'amilopectina è digerita molto rapidamente poiché le ramificazioni caratteristiche della sua struttura chimica forniscono numerosi punti di attacco per l'azione dell' α -amilasi.[42]

In secondo luogo, la conformazione a doppia elica dell'amilosio presenta il sito di azione per l' α -amilasi nella parte più interna della sua struttura rendendolo meno accessibile.[43]

L'aumento della percentuale di amilosio genera amido più lentamente digeribile e assorbibile a livello intestinale, riducendo la glicemia postprandiale, e quindi il fabbisogno di insulina. Studi randomizzati e controllati che hanno utilizzato cereali ad alto contenuto

di amilosio hanno mostrato che tali prodotti possono ridurre in maniera significativa sia la risposta glicemica che quella insulinemica nel periodo postprandiale.[42]

Ad oggi, non è noto l'effetto dell'amido resistente sulla lipemia postprandiale.

2.2. Polifenoli

2.2.1. Definizione, struttura e classificazione

I polifenoli sono composti bioattivi di origine vegetale largamente diffusi in frutta, verdura, cereali, olive, legumi, cioccolata ed in alcune bevande come tè, caffè e vino. Sono composti fondamentali nella fisiologia della pianta, in quanto contribuiscono a preservare la loro integrità in risposta alla continua esposizione a tensioni ambientali (raggi UV, alte temperature, aggressione di microrganismi e insetti). Inoltre, sono responsabili della pigmentazione e delle caratteristiche organolettiche degli alimenti che li contengono.[44]

Il termine “polifenoli” si riferisce a numerose classi di composti aventi una struttura chimica comune, cioè almeno un anello fenolico e una catena carboniosa con uno o più gruppi idrossilici. Pertanto da un punto di vista chimico, i polifenoli sono classificati in:

- a) polifenoli contenenti nella molecola un solo anello fenolico con un gruppo funzionale terminale carbossilico (acidi fenolici) o ossidrilico (alcoli fenolici);
- b) polifenoli contenenti due anelli fenolici con struttura lineare (stilbeni) o ramificata (lignani);
- c) polifenoli con più anelli fenolici (flavonoidi).[45]

2.2.1a. Acidi fenolici

Questi composti possono essere suddivisi in: acidi idrossibenzoici e acidi idrossicinnamici.[45]

Gli acidi idrossibenzoici, come l'acido gallico e l'acido protocatecuico, si trovano in pochissimi vegetali commestibili per l'uomo e, pertanto, sono di scarso interesse nutrizionale. Il loro contenuto è generalmente molto basso, fatta eccezione per le more (che ne contengono fino a 270 mg/kg di peso), le foglie di tè (che rappresentano una fonte importante di acido gallico: $\leq 4,5$ g/kg), i lamponi (che contengono fino a 100 mg di acido protocatecuico/kg) e l'olio di oliva (la cui concentrazione di acido protocatecuico è di circa 0,22 mg/kg). Tuttavia, va considerato che le concentrazioni di acido protocatecuico in circolo potrebbero essere superiori alla quantità ingerita con gli alimenti, perché questo composto nell'uomo rappresenta il metabolita più importante delle antocianidine, come la cianidina-3-glucoside.[44,46]

Gli acidi idrossicinnamici più diffusi sono soprattutto gli acidi cumarico, ferulico e caffeico. Raramente si trovano in forma libera, generalmente sono legati a derivati glicosidici o ad esteri dell'acido chinico, schimico o tartarico. Gli acidi chinico e caffeico si combinano per formare l'acido clorogenico, che si trova in molti tipi di frutta e in alte concentrazioni nel caffè (una tazza può contenerne fino a 350 mg). L'acido caffeico è l'acido fenolico più abbondante, rappresentando tra il 75% e il 100% degli acidi idrossicinnamici totali contenuti nella maggior parte dei frutti. L'acido ferulico è l'acido fenolico più abbondante nei cereali; nei chicchi di frumento è presente per lo 0,8-2 g/kg del peso secco, pari a circa il 90% dei polifenoli totali.[44,46]

4.2.1b. Alcoli fenolici

Il tirosolo (4-idrossifeniletanolo) e l'idrossitirosolo (3,4-di-idrossifeniletanolo) sono alcoli fenolici contenuti nell'olio extravergine di oliva. La concentrazione media di alcoli fenolici totali nell'olio extravergine di oliva commerciale è di circa 180 mg/kg. Essa dipende dalla varietà delle olive, dal clima, dalla zona di crescita, dalla latitudine e dalla maturazione. Il

tirosolo è presente anche nei vini bianchi e rossi, e nella birra, mentre l'idrossitirosolo si trova solo nel vino rosso ed è prodotto anche *in vivo* dopo l'ingestione.[44,46]

2.2.1c. Stilbeni

L'uomo, con la dieta, assume piccole quantità di stilbeni: il più rappresentativo è il resveratrolo, presente nelle forme isomeriche *cis* e *trans*, di cui quest'ultima risulta essere la più stabile. E' stato rilevato in più di 70 specie di piante, tra cui uva, frutti di bosco e arachidi. Abbonda nella buccia fresca delle uve rosse (50-100 g/kg di peso netto) e, pertanto, raggiunge concentrazioni relativamente alte nel vino rosso e nel succo d'uva.[44,46]

2.2.1d. Lignani

I lignani sono presenti in natura per lo più in forma libera, ed in minore quantità come derivati glicosidici. Il più noto è il secoisolariciresinolo presente nei semi di lino (3,7 g/kg di peso secco). Il microbiota intestinale metabolizza i lignani a enterodiolo e enterolattone; le concentrazioni nel plasma e nelle urine non rendono ragione delle basse quantità di lignani solitamente contenute nella dieta. Ciò lascia intendere che ci siano altri lignani di origine vegetale non ancora identificati che fungono da precursori di enterodiolo e enterolattone.[44,46]

2.2.1e. Flavonoidi

I flavonoidi sono largamente distribuiti nel regno vegetale e vengono normalmente assunti tramite cereali, frutta, verdura, legumi nonché con le più comuni bevande quali tè, vino e birra. [44,46]

Appartengono alla classe dei flavonoidi:

- Flavoni (apigenina e luteolina). Possiedono un doppio legame tra le posizioni C2 e C3 e sono i flavonoidi meno comuni.[45] Le uniche fonti alimentari di flavoni sono prezzemolo e sedano. La buccia dei frutti contiene grandi quantità di flavoni polimetossilati: ad esempio nella buccia di mandarino il loro contenuto arriva fino a 6,5 g/L di olio essenziale di tale frutto.[44,46]
- Flavonoli. Presentano un doppio legame tra le posizioni C2-C3 e un ossidrile in C3. Essi rappresentano i flavonoidi più abbondanti negli alimenti, di cui la quercetina risulta il composto più diffuso.[45] Le principali fonti di flavonoli sono le cipolle (fino a 1,2 g/kg di peso fresco), il cavolo riccio, i porri, i broccoli ed i mirtilli. Il tè ed il vino rosso possono contenere fino a 45 e 30 mg di flavonoli/L, rispettivamente. E' importante notare che la biosintesi dei flavonoli è stimolata dalla luce; infatti, essi si accumulano nel tessuto esterno della frutta. Possono, inoltre, esistere differenze di concentrazione di flavonoli tra frutti dello stesso albero e anche nelle diverse parti dello stesso frutto, a seconda dell'esposizione alla luce del sole.[44,46]
- Flavanoni. Sono caratterizzati dalla presenza di una catena satura di tre atomi di carbonio e un atomo di ossigeno in C4. Sono generalmente glicosilati da un disaccaride in C7. I flavanoni sono presenti in alte concentrazioni negli agrumi, ma anche nei pomodori ed in alcune piante aromatiche come la menta. I principali flavanoni sono la narigenina nel pompelmo, l'esperidina e la narirutina nelle arance, e l'eriodictolo nei limoni.[45]

Un succo d'arancia contiene circa 470-761 mg/L di esperidina e 20-86 mg/L di narirutina. La parte solida degli agrumi, in particolare la porzione spugnosa bianca (l'albedo) e le membrane che separano il frutto in segmenti, hanno un contenuto molto alto in flavanoni: questa è la ragione per cui il frutto intero può contenere fino a 5 volte più flavanoni di un bicchiere di succo d'arancia.[44,46]

- Flavan-3-oli (o flavanoli). Sono caratterizzati nell'anello C da tre atomi di carbonio saturi, un gruppo ossidrilico in C3 e assenza dell'ossigeno in C4. Esistono in forma di monomeri (catechine) e di polimeri (proantocianidine). A differenza di altre classi di flavonoidi, questi non sono glicosilati negli alimenti, ma spesso si ritrovano in forma acilata.[45]

Le catechine vengono classificate in: catechine, epicatechine, gallocatechine, epigallocatechine e epigallocatechin-gallato. Le catechine ed epicatechine si trovano in molti frutti come le albicocche (250 mg/kg del peso) e le ciliegie (250 mg/kg del peso) e nel vino rosso (fino a 300 mg/L). Le gallocatechine, epigallocatechine e epigallocatechin-gallato abbondano nel tè verde (fino a 800 mg/L) e nel cioccolato (fino a 600 mg/L).[44,46]

Le proantocianidine, note anche come tannini condensati, sono dimeri, oligomeri e polimeri delle catechine. E' molto difficile valutare il loro contenuto nei cibi, perché molto diverse per struttura e peso molecolare. Nelle mele da sidro, per esempio, il grado di polimerizzazione delle proantocianidine va da 4 a 11 monomeri. Sono responsabili del carattere astringente della frutta (uva, mele, frutti di bosco, ecc) e di alcune bevande (vino, sidro, tè, birra ecc) e dell'amarezza del cioccolato. È importante notare che questa astringenza cambia nel corso della maturazione e spesso scompare quando il frutto raggiunge la maturazione.[44,46]

- Isoflavoni. Presentano la struttura base dell'1-2 difenil-propano. Hanno somiglianze strutturali con gli estrogeni, cioè gruppi ossidrilici in posizione C7 e C4, come la molecola di estradiolo. Possono legarsi ai recettori per gli estrogeni e sono quindi classificati come fitoestrogeni.[45]

Gli isoflavoni sono contenuti quasi esclusivamente nelle piante leguminose. La soia ed i suoi prodotti derivati rappresentano la principale fonte di isoflavoni, e contengono le tre molecole principali (genisteina, daidzeina e gliciteina) che si

presentano come agliconi o, più spesso, come glucosidi. I germogli di soia contengono tra 140 e 1530 mg /kg in peso e il latte di soia può contenere tra i 12 e i 130 mg/L^{10;12}. [44,46]

- Antociandine. sono pigmenti solubili in acqua, responsabili dei colori rosso, blu e viola di frutta, verdura, fiori e altri tessuti o prodotti vegetali. Esse si presentano principalmente come glicosidi, in cui il residuo di zucchero è principalmente legato alla posizione 3 dell'anello C o alle posizioni 5 e 7 dell'anello A. Sebbene molto rara, la glicosilazione è stata osservata anche in posizione 3', 4' e 5' dell'anello B. Il residuo di zucchero può essere anche acilato da diversi acidi aromatici o alifatici: il più comune è l'acido cinnamico.[45]

Le antocianidine sono ampiamente distribuite nell'alimentazione umana: sono presenti nel vino rosso (fino a 350 mg/L), in alcune varietà di cereali e in alcune verdure (cavoli, fagioli, cipolle, ravanelli), ma abbondano soprattutto nella frutta laddove il contenuto è generalmente proporzionale all'intensità del colore ed al grado di maturazione; nel ribes nero e nelle more raggiunge valori fino a 2-4 g/kg. Sono presenti soprattutto nella buccia della frutta, ad eccezione di alcuni frutti rossi (ciliegie e fragole) in cui sono presenti anche nella polpa.[44,46]

Concludendo, i polifenoli, per le loro caratteristiche chimiche, sono classificati in 5 classi principali: acidi fenolici, alcoli fenolici, stilbeni, lignani e flavonoidi. (figura 2) Tuttavia, da un punto di vista nutrizionale, i polifenoli possono essere classificati in flavonoidi, che rappresentano la maggior parte dei polifenoli assunti con la dieta, e non flavonoidi. (figura 3)

Figura 2. Classificazione e principali fonti dei polifenoli.

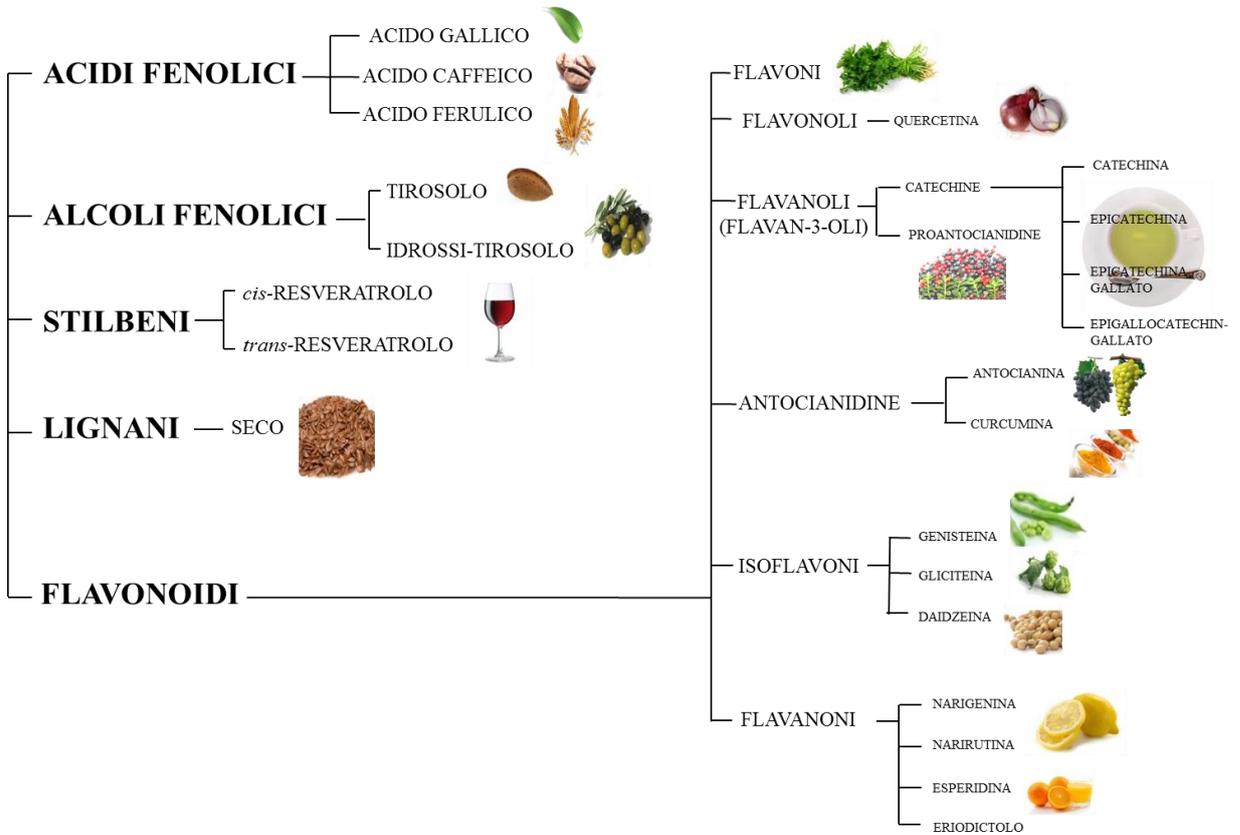
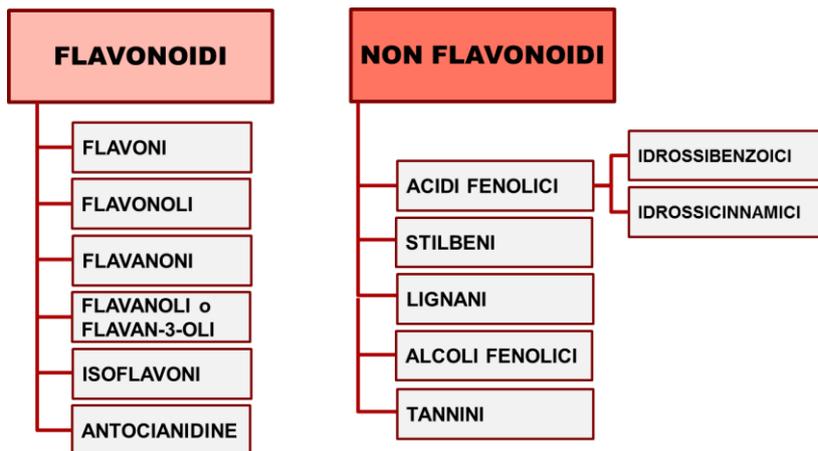


Figura 3. Classificazione nutrizionale dei polifenoli.



2.2.2. Biodisponibilità e metabolismo

Sebbene esistano diverse definizioni di biodisponibilità, la più appropriata da un punto di vista nutrizionale sembra essere "la frazione di nutriente o composto somministrato che raggiunge la circolazione sistemica e i suoi target specifici nell'organismo dove può esercitare la propria azione biologica". Per quanto riguarda i polifenoli, la biodisponibilità sembra differire notevolmente tra i vari composti fenolici. Tale differenza è legata a diversi fattori riconducibili a due gruppi fondamentali: caratteristiche del composto fenolico e dell'alimento che lo veicola e fattori relativi all'ospite (cioè il consumatore).[47,48] In particolare, i principali fattori che influenzano la biodisponibilità dei polifenoli sono:

- fattori legati ai composti fenolici (struttura chimica, concentrazione negli alimenti, la quantità introdotta);
- fattori ambientali (esposizione al sole, grado di maturazione, disponibilità del cibo);
- fattori legati alla matrice alimentare (liquido o solido, matrice animale o vegetale);
- presenza di effettori positivi o negativi di assorbimento (ad esempio grassi e fibre, che facilitano o inibiscono l'assorbimento, rispettivamente);
- processi di trasformazione dell'alimento (omogeneizzazione, cottura e metodi di preparazione culinaria, come ad esempio sminuzzamento, taglio, macinatura, raffinazione, rettifica, sbucciatura);
- fattori intrinseci all'organismo ospite: fattori intestinali (attività enzimatica, pH gastrico, efficacia dei trasportatori di membrana, tempo di transito, composizione del microbiota) o sistemici (sesso, età, patologie, genetica e condizioni fisiologiche);
- interazione con altri composti presenti nei fluidi biologici (albumina, aminoacidi).[47,48]

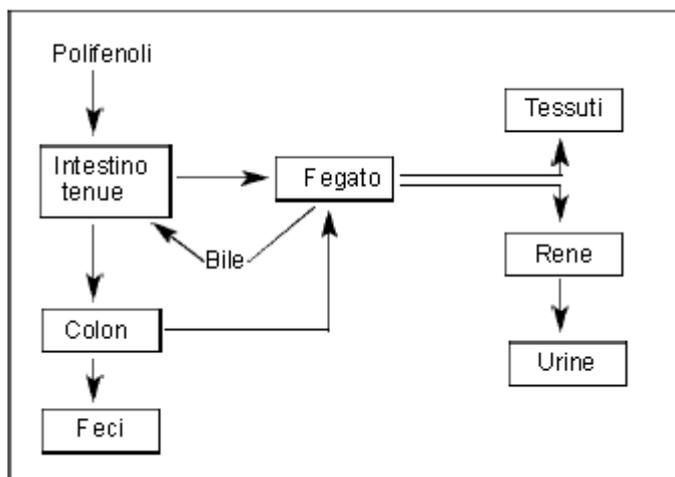
Il metabolismo dei polifenoli è abbastanza conosciuto anche se, ad oggi, alcuni aspetti rimangono poco noti.

In generale, dopo l'ingestione con la dieta, i polifenoli subiscono dei primi processi di idrossilazione nel cavo orale e vengono rilasciati in minima parte dalla matrice alimentare come agliconi liberi (molecola organica non glicosidica). In seguito, grazie all'azione del microbiota intestinale, subiscono diverse reazioni chimiche come: clivaggio dell'anello fenolico, riduzione dei doppi legami, ossidazione, deglicosilazione, deglucuronidazione, demetilazione (metaboliti di fase I). Dopo l'assorbimento intestinale, tramite la vena porta, i metaboliti fenolici raggiungono il fegato dove vengono coniugati da reazioni di metilazione, sulfazione e glucuronidazione (metaboliti di fase II). Inoltre, grazie alla circolazione entero-epatica, possono verificarsi ulteriori modifiche dei metaboliti fenolici che potrebbero diversificare ulteriormente il profilo dei metaboliti fenolici.

Studi di cinetica e biodisponibilità hanno dimostrato che i metaboliti dei polifenoli hanno un periodo di permanenza prolungato nel flusso sanguigno (fino a 24-48 ore), prima di essere escreti nelle urine e, in minima parte, nelle feci, come composti liberi o come coniugati epatici, a seconda della struttura chimica del composto fenolico introdotto con la dieta.[48-50]

Una delle principali lacune della letteratura scientifica è la comprensione del ruolo del metabolismo epatico e post-colonico nella trasformazione delle catene carboniose di alcuni metaboliti fenolici prima della loro escrezione nelle urine. Inoltre, non è noto se queste modifiche possano influenzarne l'attività biologica. Tuttavia, ciò che è chiaro, è che i polifenoli introdotti con l'alimentazione sono ampiamente modificati durante il processo metabolico, e di conseguenza, i composti fenolici che raggiungono cellule e tessuti sono spesso chimicamente, biologicamente e in molti casi funzionalmente diversi da quelli ingeriti.[48] (figura 4)

Figura 4. Schema riassuntivo del destino metabolico dei polifenoli introdotti con la dieta.[51]



2.2.3. Effetti dei polifenoli sul metabolismo glico-lipidico

Numerosi studi prospettici hanno evidenziato gli effetti protettivi di flavonoli, flavoni o catechine rispetto alla malattia coronarica fatale o non fatale, con una riduzione del rischio di mortalità del 65%; inoltre, elevate assunzioni di kaempferolo, naringenina, ed esperetina sono associate alla riduzione dell'incidenza della malattia cerebrovascolare.[52-54] Un maggiore apporto di quercetina e miricetina, invece, è associato con la riduzione del rischio di diabete di tipo 2.[53-56]

I meccanismi che potrebbero spiegare tali associazioni sono da ricondurre alla possibile azione benefica dei polifenoli sui principali fattori di rischio cardiometabolico.

In primo luogo, grazie all'azione antiossidante svolta da alcuni tipi di polifenoli, i fenomeni ossidativi a carico delle LDL circolanti potrebbero essere contrastati, prevenendo, in tal modo lo sviluppo della placca aterosclerotica e la conseguente attivazione delle chemochine in risposta al danno endoteliale.[57] In secondo luogo, alcuni studi suggeriscono che alimenti ricchi in flavan-3-oli (uva, vino, frutti di bosco, mele, cioccolato e tè) possano avere una potenziale attività antiaterogena, non solo riducendo i

livelli plasmatici di lipoproteine proaterogene contenenti apolipoproteina B (ApoB) (cioè, VLDL IDL e LDL), ma migliorando anche l'omeostasi lipidica complessivamente.[58-61] Infatti, diversi studi sull'uomo hanno riportato una riduzione significativa nel plasma del colesterolo totale, una netta riduzione del colesterolo LDL e un aumento del colesterolo HDL dopo l'integrazione con gli alimenti contenenti polifenoli, in particolare proantocianidine. Studi *in vitro* suggeriscono che l'effetto ipolipemizzante dei polifenoli potrebbe essere legato al rallentato assorbimento intestinale dei lipidi per l'inibizione della lipasi pancreatica e alla successiva ridotta secrezione di chilomicroni a causa di una minore disponibilità nell'enterocita di lipidi necessari all'assemblaggio di tali lipoproteine.[62] Tuttavia, una metanalisi di studi di intervento più recente non ha evidenziato nessun effetto significativo dei polifenoli sui parametri lipidici.[63]

Per quanto riguarda l'effetto dei polifenoli sull'omeostasi glicemica, numerosi studi *in vitro* e su animali supportano un ruolo benefico di tali composti sulla digestione dei carboidrati, sulla sensibilità e secrezione dell'insulina, attraverso l'attivazione di diversi percorsi molecolari intracellulari.[64] Pochi studi clinici hanno esplorato questo tema negli esseri umani, confermando in gran parte gli effetti benefici di una supplementazione a base di estratti di alimenti ricchi in polifenoli [65], o del consumo regolare per un breve periodo di singoli alimenti che ne sono ricchi (tè verde, cioccolato e vino rosso).[66,67]

Studi *in vitro* hanno mostrato che la struttura molecolare di specifici polifenoli permette loro di interferire con la digestione dei carboidrati a livello intestinale e di ridurre e/o prolungare l'assorbimento del glucosio. Inoltre, i polifenoli possono ridurre il trasporto di glucosio nel sangue attraverso l'inibizione di specifici trasportatori di glucosio nel lume intestinale.[68,69] Non è noto il meccanismo alla base dell'effetto sulla secrezione insulinica.

In conclusione, l'evidenza disponibile sull'effetto dei polifenoli sul metabolismo glicolipidico nell'uomo è tuttora piuttosto lacunosa. Ciò è dovuto in larga parte a problemi

metodologici che non permettono di confrontare adeguatamente gli studi o trarre conclusioni definitive. In particolare, pochi studi di intervento hanno esaminato l'effetto dei polifenoli nel medio-lungo termine, confermando in gran parte gli effetti benefici dell'aggiunta con estratti da alimenti ricchi di polifenoli o il consumo regolare per un breve periodo di singoli alimenti. La maggior parte degli studi è stata condotta prendendo in considerazione una singola classe di polifenoli o singolo composto fenolico, spesso utilizzando dei supplementi invece della dieta, perdendo, quindi, la possibilità di esplorare anche gli eventuali effetti della matrice alimentare e/o dell'interazione tra varie molecole. Inoltre, notevole variabilità è riscontrabile in termini di dosi e fonti di polifenoli e, soprattutto, nella composizione degli estratti somministrati. Infine, una criticità è rappresentata anche dalla valutazione della *compliance* al trattamento e del contenuto reale di polifenoli somministrato con l'intervento.

3. Adesione alle raccomandazioni nutrizionali per il consumo di alimenti di origine vegetale

Nonostante gli effetti benefici sul metabolismo glico-lipidico di alimenti di origine vegetale quali cereali integrali, frutta e verdura siano noti, dati recenti derivanti da indagini sui consumi alimentari indicano uno scarso consumo di tali alimenti in tutto il mondo, anche nei paesi mediterranei.[17,70-72]

Le ragioni alla base della scarsa adesione alle raccomandazioni sul consumo di alimenti di origine vegetale sono molteplici; in primo luogo, i cibi integrali hanno caratteristiche organolettiche meno attraenti rispetto ai loro corrispettivi raffinati, soprattutto per quanto riguarda il gusto e il sapore.[73] In secondo luogo, molti alimenti che rappresentano delle buone fonti di fibra possono causare *discomfort* intestinale. Inoltre, le abitudini socio-culturali sono cambiate nel corso degli anni: molte persone sono abituate a consumare i

pasti fuori casa (ad esempio, in ristoranti, caffetterie, mense aziendali) dove la scelta di cibi più salutari è spesso piuttosto problematica.[74]

Infine, la quantità di tempo e denaro impiegati per l'acquisto e la preparazione di alimenti di origine vegetale ricchi in composti bioattivi sono stati citati come ostacoli per un'alimentazione più salutare.[75]

Pertanto, al fine di indirizzare le scelte dei consumatori verso specifici alimenti di origine vegetale, sarebbe opportuno individuare gli alimenti più ricchi di composti bioattivi capaci di influenzare il metabolismo glico-lipidico e le loro quantità minime efficaci compatibili con una dieta abituale.

Inoltre, un'ulteriore strategia potrebbe essere rappresentata dal consumo di alimenti pronti all'uso capaci di influenzare il metabolismo glico-lipidico contribuendo così al miglioramento delle abitudini alimentari della popolazione occidentale.

In questo contesto, gli alimenti funzionali potrebbero contribuire alla promozione della salute nella popolazione generale.

4. Alimenti funzionali

L'obiettivo primario di una sana e corretta alimentazione è fornire nutrienti sufficienti a soddisfare le esigenze nutrizionali dell'organismo per assicurare un adeguato funzionamento di tutti i processi vitali. Tuttavia, con il passare degli anni, nelle società ricche ed industrializzate grazie alle nuove conoscenze nel campo della scienza della nutrizione si è avuto un passaggio dal concetto di "nutrizione adeguata" a quello di "nutrizione ottimale". La spinta verso questa nuova frontiera della scienza della nutrizione è stata dettata da alcuni fenomeni rilevanti che caratterizzano la nostra società attuale, quali il crescente costo della sanità e dei giorni di assenza dal lavoro, il continuo aumento dell'aspettativa di vita, l'aumento del numero di persone anziane, il desiderio di una migliore qualità della vita. Pertanto, oggi, la ricerca in campo nutrizionale è focalizzata

sull'identificazione di componenti della dieta biologicamente attivi potenzialmente in grado di ottimizzare il benessere fisico e mentale e di ridurre anche il rischio di contrarre malattie. Inoltre, sempre più risorse vengono impiegate per sviluppare nuovi alimenti arricchiti o addizionati di tali composti utili per i loro effetti benefici sulla salute o per i favorevoli effetti fisiologici. Questi alimenti vengono raggruppati nella classe degli "alimenti funzionali".[76]

Secondo l'*European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe* (FUFOSE) un alimento può essere definito "funzionale" se "è stata adeguatamente dimostrata la sua capacità di modificare in maniera benefica una o più funzioni fisiologiche del corpo umano, indipendentemente dagli effetti di una alimentazione adeguata, inducendo significativi benefici per la salute fisica e mentale e/o una riduzione del rischio di malattia". Inoltre, deve "presentarsi sotto forma di un vero alimento e deve poter esercitare i suoi effetti in quantità che possono essere consumate nella dieta".[77]

Gli alimenti funzionali si dividono in "convenzionali" e "modificati". Alla prima categoria appartengono i cereali integrali, la frutta secca, la soia, i pomodori, alimenti in cui le componenti fisiologicamente attive (ad esempio fibra, β -carotene, licopene, etc.) sono già naturalmente presenti nell'alimento.

Invece, rientrano nella seconda categoria i prodotti per i quali la tecnologia:

- a) arricchisce o addiziona l'alimento di uno o più componenti con effetti benefici (es. fibra, prebiotici, vitamine, etc.);
- b) rimuove dall'alimento uno o più componenti con effetti negativi (es. proteine allergizzanti, alcol etc.);
- c) sostituisce un componente con un altro con effetti benefici (es. sostituzione di grassi con inulina ad alto peso molecolare);

d) migliora la biodisponibilità di molecole con effetti benefici per la salute (es. la fermentazione della farina di frumento integrale aumenta la biodisponibilità dell'acido ferulico). [76,78]

Cereali integrali, frutta, verdura e legumi rappresentano gli alimenti funzionali convenzionali più utili per la riduzione del rischio di sviluppare malattie cardiovascolari e diabete tipo 2.

Tra gli alimenti funzionali modificati si inseriscono i cibi nei quali i grassi e gli zuccheri semplici, che rappresentano un'importante fonte di energia e contribuiscono all'incremento dell'incidenza di sovrappeso e obesità, vengono sostituiti per ottenere alimenti a basso contenuto energetico.

Nei formaggi freschi, ad esempio, la sostituzione dei grassi con acqua permette di ridurre il loro valore calorico fino al 40% (formaggi light). Nell'industria alimentare, l'inulina ad alto peso molecolare (HP), è usata in sostituzione dei grassi per la produzione di creme spalmabili a basso contenuto in grassi, grazie alla sua scarsa solubilità in acqua. Infatti, l'inulina HP miscelata all'acqua o al latte, forma microcristalli che conferiscono un aspetto cremoso.

Anche gli alimenti a basso indice glicemico ottenuti mediante l'arricchimento con fibre altamente viscosi (β -glucano e *psyllium*) sono considerati come alimenti funzionali modificati.

Un altro beneficio derivante dall'arricchimento in fibre degli alimenti è la riduzione della loro densità energetica che contribuisce ad incrementare il senso di sazietà prevenendo l'aumento del peso corporeo.

Infine, un'altra categoria di alimenti funzionali modificati è rappresentata da prebiotici, probiotici e simbiotici. I prebiotici (frutto-oligosaccaridi, oligosaccaridi, inulina, etc) sono composti che non vengono idrolizzati dagli enzimi digestivi dell'uomo e raggiungono il colon dove sono fermentate dalla flora batterica intestinale. I probiotici sono alimenti nei

quali si ritrovano organismi vivi quali bacilli lattici, bifido batteri, etc., mentre i simbiotici nascono dall' associazione di pre e probiotici. Il consumo di questi prodotti favorisce la crescita selettiva di bifido batteri e lattobacilli, aumenta la resistenza dell'intestino alle infezioni da parte dei batteri patogeni e migliora l'infiammazione. Inoltre, l'interesse per questa classe di composti funzionali in relazione al diabete deriva da evidenze scientifiche che suggeriscono che la flora batterica intestinale è coinvolta nello sviluppo dell'obesità e dell'insulino-resistenza.[76,78]

Numerosi sono gli alimenti funzionali che hanno dimostrato di esercitare proprietà benefiche sul controllo dei fattori di rischio cardiometabolico, come ad esempio lo scompenso glicemico, l'iperlipidemia e sovrappeso/obesità.

Tali benefici possono essere tradotti in "*claim*", cioè il riconoscimento di particolari caratteristiche di un alimento che possano indurre un beneficio sulla salute del consumatore.

I *claim* fanno riferimento a qualsiasi comunicazione diretta al consumatore in riferimento alle proprietà di un alimento, di una sostanza di origine alimentare o di un ingrediente utilizzato per la produzione di cibo e comprende sia informazioni contenute in etichetta che spot pubblicitari sotto forma di materiale scritto, orale o visivo.[76]

Secondo la normativa della Comunità Europea relativa alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari, i *claim* possono essere suddivisi in *claim* nutrizionali e *claim* salutistici.[79]

I *claim* nutrizionali si riferiscono a qualunque indicazione che affermi, suggerisca o sottintenda che un alimento abbia particolari proprietà nutrizionali benefiche, dovute:

1. all'energia (valore calorico) che l'alimento apporta, apporta a tasso ridotto o accresciuto o non contiene ;
2. alle sostanze nutritive o di altro tipo che l'alimento contiene, contiene in proporzioni ridotte o accresciute, o non contiene.

I *claim* nutrizionali consentiti sono inseriti in uno specifico elenco dell'Unione Europea; ad oggi, quelli autorizzati sono relativi a: contenuto di energia (a basso contenuto calorico, a ridotto contenuto calorico o senza calorie), macronutrienti (a basso contenuto

I *claim* salutistici (o *health claims*) che possono essere attribuiti agli alimenti funzionali possono essere:

- *Claim* di tipo A o *Functional claim*: “miglioramento di una funzione biologica” in riferimento a specifiche attività fisiologiche, psicologiche e biologiche di un nutriente o un non-nutriente, che vanno oltre il loro ruolo accertato nei processi di crescita e sviluppo o in altre normali funzioni dell'organismo, senza riferimento ad effetti positivi sulla salute o alla prevenzione di malattie.
- *Claim* di tipo B o *Health claim*: “riduzione del rischio di malattia” che si riferisce al consumo di un alimento o di un componente alimentare che potrebbe contribuire alla riduzione del rischio di una malattia o di una condizione patologica.

I *claim* nutrizionali non prevedono una specifica procedura per la loro autorizzazione, ma devono soddisfare i criteri previsti dalla normativa. Al contrario, gli *health claims* sono autorizzati dalle Autorità competenti solo dopo una specifica procedura di valutazione.

I responsabili in materia di assegnazione di “*health claims*” sono l'*European Food Safety Authority* (EFSA) e la *Food and Drug Administration* (FDA), in Europa e USA, rispettivamente.

Secondo la normativa vigente in Europa e USA, un *health claim* può essere autorizzato solo dopo una valutazione scientifica indipendente effettuata dall'EFSA e dall'FDA, rispettivamente. L'iter di valutazione è avviato solo in seguito ad una specifica domanda trasmessa alle Agenzie da un richiedente, e non per iniziativa delle stesse.

Il principio fondamentale e condiviso da entrambe le Agenzie alla base della procedura di valutazione è che un *health claim* deve essere scientificamente corroborato, tenendo conto della totalità dei dati scientifici disponibili e valutando le evidenze derivanti da studi di

intervento metodologicamente validi condotti nell'uomo. Pertanto, il richiedente ha la responsabilità di fornire tutte le informazioni e i dati relativi alla dimostrazione della fondatezza scientifica del *claim*.^[76]

In particolare, l'EFSA ha elaborato un formato standard per la preparazione e presentazione della richiesta di autorizzazione per facilitare i richiedenti a formulare in modo appropriato e strutturato le domande.^[80] Il fascicolo di richiesta deve contenere i seguenti elementi:

1. Caratterizzazione dell'alimento/componente. I dati sulla caratterizzazione (digestione, assorbimento, metabolismo, biodisponibilità, potenziale meccanismo d'azione) dovrebbero essere sufficienti da permettere alle autorità regolatorie di determinare se la sostanza oggetto di un *claim* possa determinare l'effetto per il quale si richiede il *claim*. La caratterizzazione è necessaria a fine di stabilire se l'alimento /costituente oggetto del *claim* è confrontabile con quelli utilizzati negli studi presentati a sostegno della fondatezza scientifica del *claim*. In secondo luogo, è necessario definire le condizioni d'uso adeguate e fornire informazioni riguardanti il processo di fabbricazione e la stabilità dell'alimento/costituente.
2. Rilevanza dell'effetto suggerito per la salute umana. Per ottenere un *claim* funzionale, l'effetto fisiologico oggetto del *claim* deve essere rappresentato da una funzione dell'organismo specifica che sia correlata ad un effetto benefico per la popolazione target a cui si rivolge il *claim*. Inoltre, tale funzione deve poter essere valutata *in vivo* nell'uomo con metodi validati. Per i *claim* di riduzione del rischio di malattia, l'effetto benefico oggetto del *claim* deve essere rappresentato dal miglioramento di un fattore di rischio per lo sviluppo della patologia. E' importante che il fattore di rischio sia un predittore indipendente del rischio di malattia e, inoltre, che vi sia un rapporto biologicamente plausibile tra il fattore di rischio e lo sviluppo della malattia.

3. La dimostrazione di una relazione causa-effetto tra il consumo dell'alimento/costituente e l'effetto indicato. I richiedenti sono invitati a rivedere tutte le evidenze disponibili e stabilire se esse siano sufficienti per la fondatezza scientifica del *claim*.

Ad oggi solo pochi alimenti/componenti alimentari hanno ottenuto il conferimento di un “*health claim*” da parte dell’EFSA o della FDA. In tabella 1 sono riportati i composti funzionali che hanno ottenuto il *claim* per il loro effetto su alcuni dei principali fattori di rischio cardiometabolico.

Tabella 1. Composti funzionali che hanno ottenuto il riconoscimento di un *claim* salutistico dall’EFSA e/o dall’FDA per il loro effetto su alcuni dei principali fattori di rischio cardiometabolico.[76]

Target	Composto funzionale	EFSA	FDA
Peso corporeo	Fibra (glucomannano)	X	
Colesterolo-LDL	▪ Fibra:		
	▪ β -glucano	X	X
	▪ Chitosano	X	
	▪ Glucomannano	X	
	▪ Gomma guar	X	
	▪ HPMC	X	
	▪ Pectina	X	
	▪ <i>Psyllium</i>		X
	▪ Fitosteroli	X	X
	▪ Soia		X
	▪ Monacolina K (riso rosso fermentato)	X	X
Risposta glicemica postprandiale	▪ Dolcificanti (xilitolo, sorbitolo, mannitolo, maltitolo, lactitolo, isomalto, eritritolo, D-tagatosio, isomaltulosio, sucralosio e polidestrosio)	X	
	▪ Fruttosio*	X	
	▪ Fibra (arabinosilani, β -glucani, HPMC, pectine, amido resistente)	X	
	▪ Amido lentamente digeribile	X	

HPMC: idrossipropilmetilcellulosa

* Un elevato consumo di fruttosio può portare a complicanze metaboliche come dislipidemia, insulino-resistenza e aumentata adiposità viscerale

5. Scopo e linee di ricerca

Nonostante l'importanza della relazione tra assunzione di composti bioattivi di origine vegetale e modulazione del metabolismo glico-lipidico, ancora pochi studi sono disponibili in letteratura per valutare tali effetti sull'uomo, in particolare per quanto concerne i polifenoli. Inoltre, i meccanismi alla base di tali effetti sono ancora poco chiari.

Pertanto, al fine di chiarire queste problematiche, le linee di ricerca seguite durante il corso di Dottorato si sono sviluppate in tre tematiche principali:

1. Valutazione degli effetti di una dieta ricca in cereali integrali sulla fermentazione intestinale e l'importanza di questo processo in relazione al metabolismo glico-lipidico : *Progetto HEALTHGRAIN*.
2. Valutazione degli effetti a lungo termine di diete ricche in polifenoli sul metabolismo glico-lipidico: *Progetto ETHERPATHS*.
3. Valutazione in acuto degli effetti del consumo di fette biscottate a base di frumento ricco di amilosio sul metabolismo glico-lipidico e il senso di sazietà in un gruppo di soggetti a lieve rischio cardiometabolico: *Progetto AMILOSIO*.

6. Protocolli sperimentali

6.1 HEALTHGRAIN

Background

Il consumo abituale di cereali integrali è associato alla riduzione del rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, sovrappeso/obesità e diabete tipo 2. [81,82] Uno dei meccanismi che potrebbe spiegare queste associazioni è la fermentazione della fibra dei cereali ad opera del microbiota intestinale, che induce la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA): acetato, propionato e butirato. Infatti, molti studi hanno speculato sul ruolo degli SCFA nella modulazione del metabolismo glico-lipidico.[83,84] Tuttavia, le evidenze sono ancora scarse e controverse.[85-88] Ciò può essere dovuto, almeno in parte, all'alta variabilità della fermentazione della fibra da parte del microbiota intestinale.

Studi *in vitro* [89, 90] e *in vivo* [84] hanno dimostrato che il tasso di fermentazione della fibra è strettamente legato al tipo di cereale integrale. In particolare, segale e orzo sembrano essere più fermentescibili rispetto al frumento. Inoltre, la durata di esposizione al consumo di cereali integrali può avere un ruolo rilevante. Infatti, uno studio a lungo-termine (9 mesi) ha mostrato che il consumo di frumento integrale induce la produzione di SCFA, anche se tale fenomeno richiede tempi lunghi per raggiungere un significativo aumento plasmatico dei prodotti della fermentazione della fibra.[91]

Tuttavia, gli studi nell'uomo che hanno valutato la produzione di SCFA dopo un lungo periodo di esposizione al consumo di fibra di frumento integrale sono limitati; inoltre, le evidenze derivanti da studi clinici sulla relazione tra SCFA ed effetti metabolici nell'uomo sono scarse.

Scopo

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare, in un gruppo di soggetti affetti da sindrome metabolica, l'effetto sulla concentrazione plasmatica degli acidi grassi a corta catena a digiuno di una dieta ricca in cereali integrali e a basso indice glicemico seguita per 12 settimane rispetto ad una dieta ricca in cereali raffinati e ad alto indice glicemico e di valutare l'importanza di questo processo in relazione al metabolismo glico-lipidico .

Lo studio è stato svolto nell'ambito del Progetto Europeo "HEALTHGRAIN", iniziato nel 2005 e concluso nel 2010 che aveva lo scopo di migliorare il valore nutrizionale dei cereali integrali e valutare i benefici di questi alimenti sulla salute. Il Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia dell'Università "Federico II" di Napoli ha partecipato a tale progetto con lo scopo di valutare gli effetti del consumo di cereali integrali sulla sensibilità insulinica e sul metabolismo glico-lipidico a digiuno e in fase postprandiale. I risultati di questo studio hanno mostrato che dopo 12 settimane d'intervento la dieta ricca in cereali integrali riduceva in modo significativo le concentrazioni plasmatiche d'insulina e dei trigliceridi nel periodo postprandiale rispetto a quella di controllo, a base di cereali raffinati.[92] E' stato ipotizzato, che i cereali integrali possono migliorare il metabolismo insulinico e lipidico nel periodo postprandiale attraverso la fermentazione della fibra e la produzione di acidi grassi a corta catena.

Materiali e metodi

Partecipanti. Sono stati reclutati 61 soggetti di entrambi i sessi, con età compresa tra 40 e 70 anni, affetti da sindrome metabolica secondo i criteri NCEP-ATPIII [93] che prevede la presenza di 3 o più delle seguenti anomalie:

- 1) circonferenza vita >102 cm per gli uomini e > 88 cm per le donne;
- 2) trigliceridemia a digiuno ≥ 150 mg/dl ;
- 3) colesterolo HDL a digiuno < 40 mg/dl per gli uomini e <50 mg/dl per le donne ;
- 4) glicemia a digiuno compresa tra 100 e 126 mg/dl o glicemia 2 ore dopo il carico orale di 75 mg di glucosio ≥ 140 mg/dl e < 200 mg/dl.
- 5) pressione arteriosa $\geq 130/85$ mmHg o $<130/85$ mmHg, se in trattamento con farmaci antipertensivi.

Sono stati esclusi dallo studio i soggetti affetti da diabete mellito, quelli in trattamento con farmaci in grado di influenzare il metabolismo glicidico e lipidico, con insufficienza renale (creatinina sierica > 1.5 mg/dl) e insufficienza epatica (ALT/AST > 2 volte rispetto ai valori normali), anemia (Hb < 12 g/dl) e qualsiasi altra malattia cronica.

Tutti i partecipanti hanno firmato il consenso informato prima di essere inclusi nello studio. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e registrato su ClinicalTrials.gov, numero identificativo NCT00945854.

Disegno dello studio. Lo studio, randomizzato, è stato condotto secondo un disegno a gruppi paralleli (figura 5). I partecipanti, dopo un periodo iniziale di osservazione della durata di 4 settimane (*run-in*), durante il quale hanno continuato a seguire la dieta abituale e le loro abitudini di vita, sono stati assegnati, in modo casuale, o ad una "Dieta *Health*", a base di cereali integrali e a basso indice glicemico (IG), o ad

una “Dieta Controllo” a base di cereali raffinati e ad alto IG, per la durata di 12 settimane ciascuna (figura 5). La randomizzazione è stata effettuata con stratificazione per età (categorie di 5 anni) e BMI (25-35 Kg/m²).

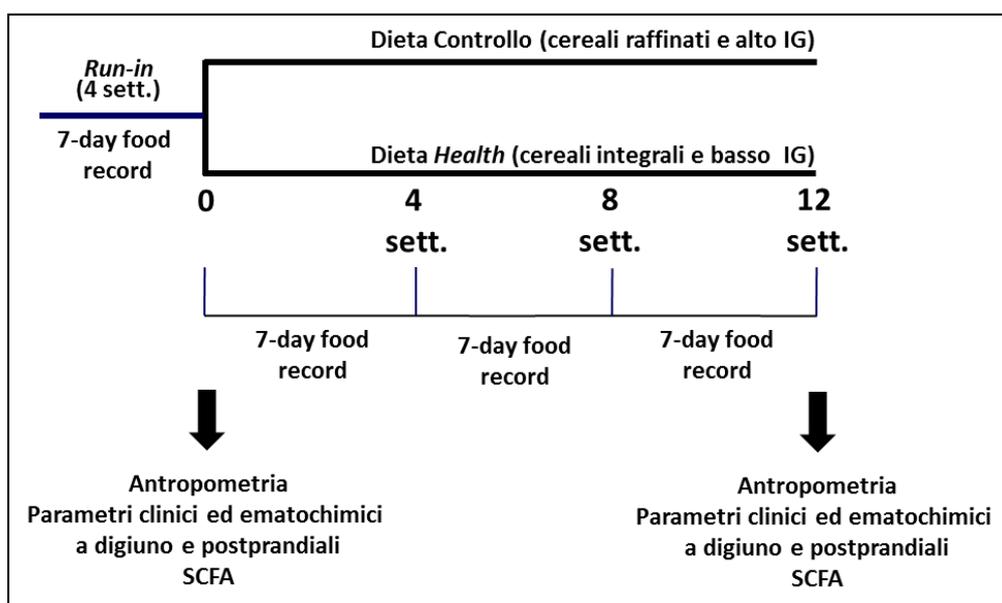
La dieta *Health* e quella Controllo erano isoenergetiche in modo da evitare che il peso corporeo variasse durante lo studio. Le due diete differivano esclusivamente per il tipo di cereali e per l'indice glicemico. La dieta *Health* era composta da cereali integrali e da alimenti a basso indice glicemico mentre la dieta Controllo da cereali raffinati e alimenti ad alto indice glicemico. La quantità di cereali nelle due diete rappresentava il 60-80% del consumo quotidiano di carboidrati totali mentre il restante 20-40% dei carboidrati derivava dalla frutta e verdura. Nella dieta *Health* gli alimenti consumati a colazione erano rappresentati dai bastoncini di crusca o da fiocchi di frumento integrale, a pranzo e/o a cena da spaghetti o altri tipi di pasta integrale, gnocchi di patate, mais e orzo (Tabella 2). Ogni giorno i pazienti consumavano circa 250 g di pane che era per il 10% pane di segale integrale, per un altro 10 % pane di frumento integrale a lievitazione acida, prodotto in Finlandia, e per l'80% pane di frumento integrale a lievitazione naturale (madre acida).

Nella dieta Controllo gli alimenti consumati a colazione erano rappresentati da riso soffiato e/o pane bianco, a pranzo e/o a cena da riso brillato a basso contenuto in amilosio, purea di patate, pizza, patate e polenta. Anche in questa dieta era previsto un consumo di circa 250 g di pane che però era un comune pane bianco di frumento ottenuto con lievitazione chimica (Tabella 2). Per migliorare e facilitare l'adesione alla dieta, ciascun partecipante allo studio ha ricevuto per tutta la durata dell'intervento sia i prodotti a base di cereali integrali o raffinati da consumare sia alcuni pasti precotti, la cui preparazione avrebbe richiesto tempi troppo lunghi da parte dei partecipanti.

La composizione bromatologica delle due diete consigliate è riportata in tabella 3. Le differenze principali si osservano nel quantitativo di fibra, in particolare di quella derivante dai cereali (32,2 g al giorno nella dieta *Health* vs. 13.2 g al giorno nella dieta Controllo), nell'IG (42.3% nella dieta *Health* vs. 74.8% nella dieta Controllo), nel Carico Glicemico (117 nella dieta *Health* vs. 210 nella dieta Controllo) (Tabella 3). La composizione delle diete sperimentali è stata calcolata mediante il software MetaDieta (Meteda s.r.l., Ascoli-Piceno).

Il fabbisogno energetico della dieta sperimentale è stato definito sulla base dell'introito energetico abituale individuale valutato mediante il diario alimentare (*7-day food record*) completato durante il *run-in*, e aggiustato per peso corporeo e giudizio clinico della dietista per evitare la possibile sottostima, comune nei soggetti in sovrappeso/obesi. Tutti i partecipanti hanno compilato il *7-day food record* a 4, 8 e 12 settimane per valutare l'adesione al trattamento dietetico.

Figura 5. Disegno dello studio.



IG: indice glicemico, SCFA: acidi grassi a corta catena

Tabella 2. Cereali utilizzati nelle due diete.

Pasto	Dieta Health	Dieta Controllo
Colazione	Bastoncini di crusca Fiocchi di frumento integrale	Riso soffiato
Pranzo	Pasta integrale Gnocchi integrali	Riso brillato Purea di patate
Spuntino	Biscotto di avena	Grissini
Cena	Orzo perlato Mais in scatola	Pizza Patate Polenta
Pane utilizzato	90% di frumento integrale a lievitazione acida 10% di segale	Pane di frumento bianco

Tabella 3. Composizione media della dieta assegnata e seguita nei due gruppi sperimentali.

	Dieta Health (n=28)		Dieta Controllo (n=26)	
	Assegnata	Seguita	Assegnata	Seguita
Energia totale (kcal)	1998	2096±435	1986	1961±303
Energia da Alcool (kcal)	-	38±51	-	32±38
Proteine (%)	21	18.3±1.4	18	17.0±1.6
Carboidrati (%)	52	52±3.7	53	54.8±3.7
Lipidi totali (%)	27	29.7±3.9	29	28.3±3.6
SFA (%)	7	8.7±1.6	7	8.8±1.5
Colesterolo totale (mg/die)	150	187±55	198	187±56
Fibra totale (g/die)	45	40±7	24	22±5
Fibra da cereali (g/die)	32	29±6	13	12±2
Carico Glicemico	114	123±26	207	192±31
Indice Glicemico	42	46±2	75	72±3

SFA: acidi grassi saturi

I partecipanti sono stati visitati da un medico e da una dietista al basale, alla fine del periodo di *run-in*, e dopo 4, 8 e 12 settimane dall'inizio dello studio. Ad ogni visita venivano rilevati il peso corporeo, la circonferenza vita, la pressione arteriosa mediante metodiche standardizzate.[94] Alla fine del *run-in* e dopo 12 settimane di intervento dietetico i parametri ematochimici sono stati misurati a digiuno per la valutazione del metabolismo glico-lipidico e della produzione di SCFA (acetato,

propionato, butirrato). Inoltre, alla fine del *run-in* e dopo 12 settimane di intervento, tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad un pasto test della durata di 3 ore per la valutazione della risposta glico-insulinemica e lipidica postprandiale.

Il pasto test consumato all'inizio dello studio era simile per ambedue i gruppi (pasto a base di cereali raffinati) mentre alla fine dell'intervento il pasto riproduceva la composizione della dieta effettuata durante l'intervento (a base di cereali integrali o a base di cereali raffinati) (tabella 4).

Tabella 4. Composizione dei pasti test.

Caratteristiche	Pasto a base di cereali raffinati	Pasto a base di cereali integrali
Alimenti	pizza margherita 200 g prosciutto crudo 100 g pomodori 150 g olio EVO 15 g mela 150g	spaghetti integrali 130 g pane integrale 50 g prosciutto crudo 100 g pomodori 150 g olio EVO 15 g mela 150g
Energia (kcal)	927	960
Proteine (%)	18	21
Grassi (%)	30	27
SFA (%)	7	6
Carboidrati (%)	52	52
Fibra totale (g/die)	12	17
Indice Glicemico	71	39
Carico Glicemico	91	51

EVO: extra-vergine di oliva, SFA: acidi grassi saturi

Procedure di laboratorio. Le concentrazioni di colesterolo, trigliceridi e glucosio sono state dosate con metodi enzimatici-colorimetrici standard (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germania) sull'autoanalizzatore Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia). Le concentrazioni di insulina sono state analizzate con metodi ELISA (DIAsource ImmunoAssays S.A., Nivelles, Belgio) automatizzati sull'autoanalizzatore Triturus (Grifols Italia SpA, Pisa, Italia).

La concentrazione di acetato, propionato e butirato sono state analizzate in gascromatografia (Hewlett Packard 5890 Series II), secondo il metodo di Remesey e Demigne.[95] Prima del dosaggio, 400 µl di plasma sono stati deproteinizzati con 50 µl di acido metafosforico (16% W/V) a 60°C per 30 minuti e addizionati di 50 µl di standard interno (acido isovalerico 80 mM). Dopo la centrifugazione (8000 rpm per 30 minuti a temperatura ambiente) tutti i campioni sono stati filtrati.

Tutte le valutazioni sono state effettuate prima e dopo l'intervento di 12 settimane dal personale che non era a conoscenza del trattamento seguito dai partecipanti.

Analisi statistica. I risultati dello studio sono stati espressi come $media \pm$ errore standard della media (SEM), se non diversamente specificato. Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo la trasformazione logaritmica.

Le differenze tra il *run-in* e la fine dell'intervento sono state analizzate mediante il t-test di Student per dati appaiati. Le differenze tra i due trattamenti, espresse come variazioni assolute osservate (valori a 12 settimane – valori al *run-in*) sono state valutate mediante l'analisi della varianza a una via (ANOVA).

Le associazioni tra le variabili dello studio sono state valutate mediante correlazione di Pearson.

L'analisi statistica è stata eseguita secondo i metodi standard mediante il software Statistical Package for Social Sciences versione 21.0 (SPSS/PC; SPSS, Chicago, IL, USA).

Risultati

Caratteristiche dei partecipanti. Dei 61 soggetti reclutati nello studio, 54 hanno completato l'intervento. Si sono verificati 2 *drop-out* nella Dieta *Health* e 5 nella dieta Controllo. Il gruppo assegnato alla Dieta *Health* era composto da 28 soggetti di cui 16 di sesso

femminile e 12 di sesso maschile mentre quello assegnato alla dieta Controllo era formato da 26 soggetti di cui 15 di sesso femminile e 11 di sesso maschile.

Tuttavia, l'analisi degli SCFA è stata effettuata solo su 40 soggetti: 19 soggetti (7 M/12 F) che hanno seguito la dieta Controllo e 21 soggetti (9 M/12 F) per la dieta *Health*.

Adesione al trattamento dietetico. Alla fine del *run-in*, l'introito energetico giornaliero del gruppo a dieta *Health* non era significativamente differente da quello del gruppo a dieta Controllo (1817 ± 520 vs. 1780 ± 420 kcal/giorno) (tabella 3).

Nel gruppo a dieta *Health* l'introito energetico rispetto al *run-in* aumentava dell'11,9%, del 16,5% e del 17,6% a 4, 8 e 12 settimane rispettivamente, mentre nel gruppo a dieta Controllo incrementava del 6,1%, 12,5% e 11,9% rispettivamente. Tali incrementi energetici erano necessari per mantenere stabile il peso corporeo.

Alla fine del *run-in* il gruppo a dieta *Health* non differiva da quello a dieta Controllo per introito di carboidrati ($49.8 \pm 5.1\%$ vs. $51.0 \pm 5.0\%$), grassi (33.1 ± 5.1 vs. $32.0 \pm 4.8\%$), proteine (17.1 ± 3.3 vs. $17.1 \pm 2.5\%$) e fibre (20.3 ± 6.0 vs. 20.4 ± 5.3 g/giorno) (tabella 3).

La composizione delle diete effettuate nei due gruppi è risultata sovrapponibile a quelle previste dal protocollo eccetto per il più basso contenuto in proteine nella dieta *Health*, indicando una soddisfacente adesione al trattamento da parte dei soggetti. Nessuna differenza in macronutrienti è stata osservata tra il gruppo a dieta *Health* e quello a dieta Controllo ma, in accordo al disegno dello studio, il gruppo assegnato alla dieta *Health* aveva un consumo di fibra da cereali significativamente maggiore (29 ± 6 g al giorno contro i 12 ± 2 g al giorno della Dieta Controllo) e l'indice glicemico (46 ± 2 vs. $72 \pm 3\%$) e il carico glicemico (123 ± 26 vs. 192 ± 31) significativamente inferiori rispetto a quello assegnato alla dieta Controllo (tabella 3).

L'adesione ottimale al trattamento dietetico è stata confermata dal dosaggio plasmatico di alchilresorcinolo, un marcatore validato del consumo di cereali integrali.[96] Infatti, è stata

riscontrata una differenza statisticamente significativa tra le variazioni di tale marcatore nei due gruppi di intervento (88.3 ± 16 versus -19.7 ± 7.0 nmol/L, Dieta *Health* e Dieta Controllo, rispettivamente, $p < 0.001$).

Parametri ematochimici a digiuno e postprandiali. Per quanto riguarda i parametri ematochimici a digiuno, al *run-in* il gruppo assegnato alla Dieta *Health* non era differente da quello assegnato alla dieta Controllo per i valori plasmatici di glicemia, insulina, trigliceridi, colesterolo totale e colesterolo HDL. Questi parametri non si modificavano dopo le 12 settimane d'intervento con la dieta *Health* e la dieta Controllo rispetto ai valori basali (tabella 5) e nessuna differenza è stata osservata tra i 2 gruppi.

Le concentrazioni di SCFA sono mostrate in tabella 6. Non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi sperimentali per le concentrazioni di acetato, propionato e butirato al *run-in*. Alla fine dell'intervento nutrizionale, è stato osservato un incremento rispetto al *run-in* delle concentrazioni a digiuno di propionato nel gruppo a dieta *Health* mentre una riduzione di tale parametro è stata osservata nel gruppo che seguiva la dieta Controllo. Di conseguenza, le variazioni assolute di propionato (calcolata come valore 12 settimane - valore al *run-in*) risultavano differenti in maniera statisticamente significativa (1.50 ± 1.0 vs. -1.30 ± 0.9 mmol/L, dieta *Health* e dieta Controllo, rispettivamente, $p: 0.048$; tabella 6).

Per quanto riguarda la risposta al pasto test, nessun effetto significativo del trattamento sperimentale è stato osservato sulla risposta glicidica. Invece, dopo 12 settimane di intervento è stata rilevata una riduzione significativa della risposta insulinica e della risposta dei trigliceridi in fase postprandiale nel gruppo a dieta *Health* rispetto alla dieta Controllo (risposta insulinica postprandiale: -17.2 ± 10 vs. 13.6 ± 6.7 mU/mL, dieta *Health* e dieta Controllo, rispettivamente; risposta dei trigliceridi postprandiale: -22.6 ± 13 vs. 11.6 ± 8.9 mg/dL, dieta *Health* e dieta Controllo, rispettivamente)

Tabella 5. Parametri ematochimici a digiuno nei due gruppi di soggetti al *run-in* e dopo 12 settimane di trattamento.

	Dieta Controllo (n=19)			Dieta Health (n=21)			ANOVA per Δ
	<i>Run-in</i>	12 settimane	Δ	<i>Run-in</i>	12 settimane	Δ	
Età (anni)	58.4±1.6			57.2±1.9			
Sesso (M/F)	7/12			9/12			
BMI (kg/m ²)	31.5±1.3	31.3±1.3	-0.20±0.2	32.1±1.4	31.9±1.4	-0.20±0.2	0.992
Glicemia (mg/dl)	105±2.8	105±0.2	-0.72±1.5	103±2.2	103±2.7	-0.38±1.7	0.882
Insulina (μ U/ml)	11.8±1.3	11.7±1.6	-0.11±1.5	14.1±1.9	13.3±1.1	-0.47±0.9	0.726
HOMA	3.08±0.3	3.09±0.5	0.01±0.4	3.61±0.5	3.36±0.3	-0.25±0.3	0.615
Trigliceridi (mg/dl)	133±9.5	136±13	2.95±12	153±36	137±15	-16.9±28	0.538
Colesterolo totale (mg/dl)	201±8.8	208±7.5	6.47±5.0	200±10	201±10	1.10±5.1	0.457
HDL-colesterolo (mg/dl)	38.7±1.5	39.8±1.5	1.11±1.2	42.9±3.2	42.3±3	-0.62±1.2	0.324

Δ : variazione assoluta (valore 12 settimane – valore al *run-in*), BMI: body mass index, HDL: lipoproteine ad alta densità, HOMA: Homeostasis Model Assessment.

I dati sono espressi come media \pm SEM.

Tabella 6. Concentrazione plasmatica di acetato, propionato e butirrato a digiuno nei due gruppi di soggetti al *run-in* e dopo 12 settimane di trattamento.

SCFA (μ mol/L)	Dieta Controllo (n=19)			Dieta Health (n=21)			ANOVA per Δ
	<i>Run-in</i>	12 settimane	Δ	<i>Run-in</i>	12 settimane	Δ	
Acetato	204±20	178±20	-26.1±18	179±14	154±18	-25.2±20	0.974
Propionato	7.58±1.1	6.29±0.9	-1.30±0.9	5.61±0.6	7.11±0.9	1.50±1.0	0.048
Butirrato	5.58±0.9	5.69±0.9	0.11±0.7	4.37±0.6	4.74±0.6	0.37±0.7	0.623

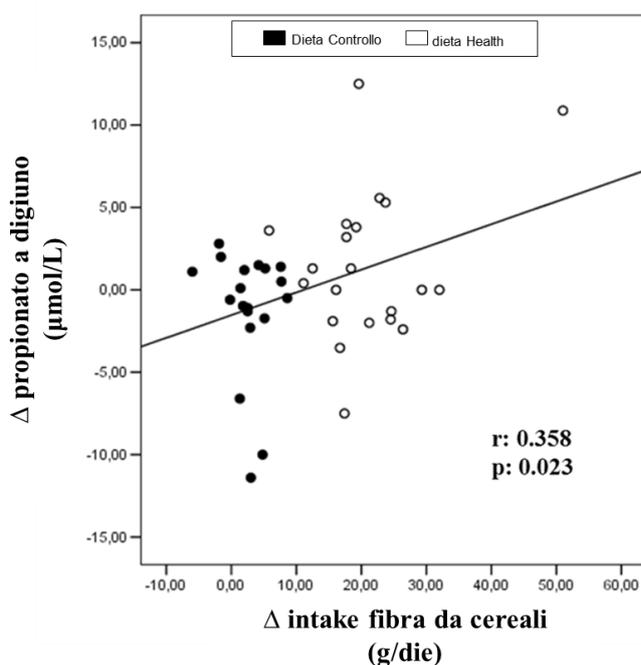
Δ : variazione assoluta (valore 12 settimane – valore al *run-in*), SCFA: acidi grassi a corta catena.

I dati sono espressi come media \pm SEM.

Relazioni tra gli SCFA e le variabili in studio. Dopo 12 settimane di intervento nutrizionale, la variazione assoluta del propionato (calcolata come valore 12 settimane - valore al *run-in*) era associata in maniera significativa all'*intake* di fibra da cereali introdotta con la dieta ($r : 0.358, p: 0.023$; figura 6).

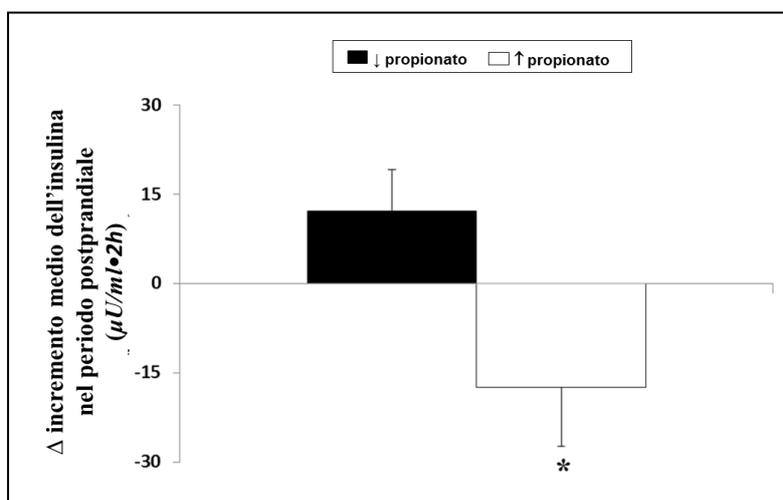
Non sono state riscontrate correlazioni significative tra le concentrazioni di SCFA e i parametri clinici valutati nello studio. Tuttavia, stratificando i partecipanti allo studio per la variazione assoluta di propionato (valore mediano: $0.0500 \mu\text{mol/L}$), è stata osservata una minore risposta insulinica media nel periodo postprandiale nei soggetti con valori di propionato al di sopra della mediana rispetto ai soggetti con valori di propionato al di sotto della mediana (-17.4 vs. 12.4 mU/mL , rispettivamente, $p: 0.022$; figura 7).

Figura 5. Correlazione di Pearson tra la variazione assoluta di propionato a digiuno e l'*intake* di fibra da cereali con la dieta



Δ: variazione assoluta (valore 12 settimane – valore al *run-in*).

Figura 7. Variazione dell'incremento medio di insulina nel periodo postprandiale dopo stratificazione per la variazione assoluta di propionato.



Δ: variazione assoluta (valore 12 settimane – valore al *run-in*).
* p: 0.020 (vs. soggetti sotto la mediana, ANOVA a una via).

Discussione

I risultati dello studio mostrano che l'adesione a una dieta ricca in cereali integrali per un periodo di 12 settimane induce un aumento significativo delle concentrazioni plasmatiche di propionato a digiuno. Inoltre, tale incremento è correlato in maniera significativa all'*intake* di fibre da cereali. Questi risultati sono supportati dall'ottima adesione alle diete raccomandate, dimostrata dal dosaggio plasmatico di alchilresorcinolo, un marcatore del consumo di cereali integrali.

I risultati dello studio suggeriscono che anche la fibra presente negli alimenti prodotti con farina di frumento integrale, come quella presente in altri tipi di cereali integrali, può essere efficacemente fermentata da parte del microbiota intestinale in 12 settimane.

In uno studio precedente, la produzione di acidi grassi a corta catena era rilevabile solo dopo 9 mesi di consumo di frumento integrale, nonostante la quantità di fibra fosse

sovrapponibile a quella presente nella nostra dieta sperimentale (40,0 vs. 40,2 g/die, rispettivamente).

Nel nostro studio, è stata osservata una riduzione significativa della risposta insulinica postprandiale nei soggetti al di sopra della mediana della concentrazione plasmatica di propionato a digiuno rispetto ai soggetti al di sotto della mediana. Questo risultato è in linea con altri studi che hanno indagato l'effetto del propionato sulla risposta insulinica postprandiale.[97-100]

Nello studio HEALTHGRAIN [92] non è stato osservato alcun miglioramento della sensibilità insulinica periferica (valutata mediante indici IVGTT-derivati); pertanto, la riduzione della risposta insulinica postprandiale osservata era legata ad una migliore sensibilità insulinica a livello splancnico. Il propionato è un prodotto della fermentazione intestinale della fibra e, dopo l'assorbimento intestinale, raggiunge il fegato dove è metabolizzato. Pertanto, possiamo ipotizzare che un aumento della produzione di propionato nel colon in seguito alla dieta ricca in cereali integrali sia in grado di migliorare l'azione dell'insulina a livello epatico.

Purtroppo, nello studio non è stata effettuata alcuna misurazione della sensibilità insulinica epatica. Tuttavia, Luo *et al.*[101] hanno dimostrato che il consumo per 4 settimane di fruttooligosaccaridi a catena corta, fibre altamente fermentescibili, riduce la produzione di glucosio epatico in un gruppo di individui sani; tale risultato, è in linea con un miglioramento della sensibilità insulinica a livello del fegato.

Senza dubbio, un intervento dietetico in grado di migliorare la sensibilità insulinica postprandiale a livello splancnico rappresenta un presidio importante per la prevenzione e la cura delle malattie cardio-metaboliche. I risultati di questo studio, in accordo alle evidenze disponibili in letteratura, suggeriscono che il consumo abituale di frumento integrale può rappresentare un valido strumento per raggiungere questo obiettivo.

Un limite del nostro studio è rappresentato dal dosaggio degli SCFA nel sangue periferico, che non ci ha consentito di valutare la quantità di SCFA che raggiunge il fegato (che rappresenta il principale sito dei loro effetti). Il dosaggio degli SCFA nelle feci sarebbe stato utile per valutare l'entità della fermentazione intestinale nei due gruppi sperimentali; purtroppo, non sono stati raccolti campioni di feci durante lo studio. Inoltre, non abbiamo informazioni sulla composizione del microbiota intestinale.

I punti di forza del nostro studio sono rappresentati dal disegno di studio ben controllato, dall'adesione ottimale all'intervento dietetico di tutti i partecipanti e dalla prolungata esposizione ad un elevato consumo di frumento integrale.

In conclusione, il consumo abituale di alimenti a base di farina di frumento integrale è in grado di promuovere la fermentazione intestinale di fibra, come suggerito dall'aumento delle concentrazioni di propionato a digiuno osservate alla fine del trattamento sperimentale (Dieta *Health*).

Inoltre, il propionato può essere coinvolto nella riduzione dei livelli insulinici postprandiali osservata dopo il consumo di cereali integrali.

6.2 ETHERPATHS

Background

L'alimentazione, grazie alla sua azione pleiotropica su molteplici meccanismi, può avere un ruolo di primaria importanza nel prevenire o correggere contemporaneamente diversi fattori di rischio cardiometabolico. Tra questi fattori di rischio, le alterazioni del metabolismo glico-lipidico a digiuno e nel periodo postprandiale sono sicuramente tra quelli più rilevanti.[102,103]

Tra i vari componenti della dieta che potrebbero influenzare il metabolismo, i polifenoli hanno suscitato molto interesse.

Numerosi studi epidemiologici hanno suggerito che i polifenoli possano esercitare un ruolo importante nella prevenzione delle malattie cardiovascolari e del diabete. [104-107]

Le evidenze derivanti da studi di intervento che hanno indagato il ruolo svolto dai polifenoli nella prevenzione del rischio cardiovascolare sono scarse e presentano risultati contrastanti. In particolare hanno evidenziato gli effetti di polifenoli contenuti in singoli alimenti (tè, cioccolato, vino rosso, etc.) e non di diete contenenti diverse fonti di polifenoli.[108-114] D'altra parte se gli effetti dei polifenoli non sono chiari, ancora più sconosciuti sono i meccanismi attraverso cui essi potrebbero agire.

Scopo

Valutare l'effetto a medio termine (8 settimane) di diete a diverso contenuto di polifenoli sul metabolismo glico-lipidico a digiuno e in fase postprandiale in individui ad elevato rischio di sviluppare diabete e malattie cardiovascolari.

Materiali e metodi

Partecipanti. Sono stati reclutati 86 soggetti, di ambo i sessi, di età compresa tra 35 e 70 anni, in sovrappeso/obesi (27-35 kg/m²), con circonferenza vita elevata (>102 cm nell'uomo e >88 cm nella donna) e almeno un altro parametro caratteristico della sindrome metabolica secondo i criteri NCEP-ATPIII [93]:

- trigliceridemia a digiuno ≥ 150 mg/dl;
- HDL- colesterolo a digiuno <40 mg/dl e nell'uomo e <50 mg/dl nella donna;
- pressione arteriosa $\geq 130/85$ mmHg;
- glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dl.

I criteri di esclusione erano: età <35 e >70 anni, trigliceridemia a digiuno ≥ 400 mg/dl, colesterolemia a digiuno >270 mg/dl, eventi cardiovascolari nei 6 mesi precedenti allo studio (infarto del miocardio o ictus), diabete mellito o qualsiasi altra patologia cronica, attività fisica intensa, insufficienza renale o epatica (creatinina >1.7 mg/dl e ALT/AST >2 volte i valori normali, rispettivamente), anemia (Hb <12 g/dl), assunzione di farmaci anti-infiammatori o ipolipemizzanti. Tutti i partecipanti hanno firmato il consenso informato prima di essere inclusi nello studio. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e registrato su ClinicalTrials.gov, numero identificativo NCT01154478.

Disegno dello studio. Lo studio è stato condotto secondo un disegno fattoriale 2x2 (Figura 8). Lo studio è stato preceduto da un periodo di osservazione di 3 settimane (*run-in*) durante il quale i partecipanti hanno continuato a seguire la loro dieta abituale. Alla fine del *run-in*, i partecipanti sono stati assegnati, in maniera del tutto casuale, ad uno dei seguenti trattamenti nutrizionali per un periodo di 8 settimane:

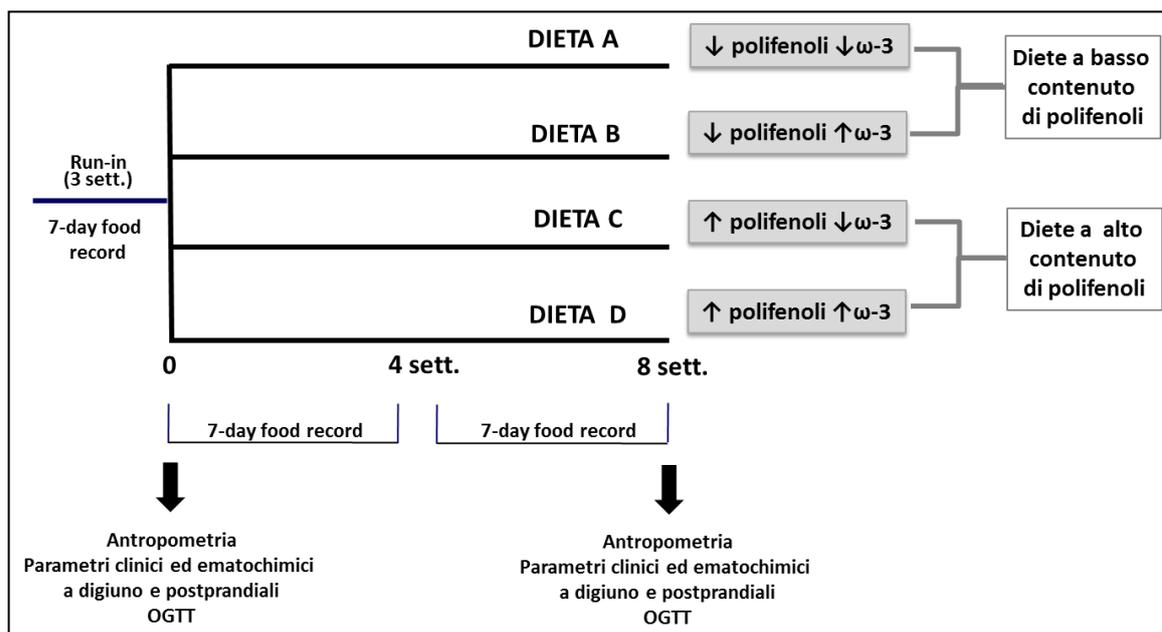
- Gruppo A: dieta a basso contenuto di acidi grassi $\omega 3$ e polifenoli (Dieta Controllo).

- Gruppo B: dieta ricca in acidi grassi $\omega 3$ e povera in polifenoli (Dieta Omega-3).
- Gruppo C: dieta ricca in polifenoli e povera in acidi grassi $\omega 3$ (Dieta Polifenoli).
- Gruppo D: dieta ricca sia in acidi grassi $\omega 3$ sia in polifenoli (Dieta Omega-3 + Polifenoli).

La randomizzazione, stratificata per età, sesso, BMI e trigliceridi plasmatici, è stata effettuata con il metodo di minimizzazione utilizzando il software MINIM (www.users.york.ac.uk). Le quattro diete erano isoenergetiche, per evitare le variazioni di peso corporeo durante lo studio, ed avevano la stessa composizione in macro e micronutrienti. (Tabella 7).

Tuttavia, ai soli fini di questa tesi di Dottorato, le diete sono state raggruppate in accordo al contenuto di polifenoli, considerando la Dieta Controllo e la Dieta Omega-3 come “diete a basso contenuto di polifenoli” e la Dieta Polifenoli e la Dieta Omega-3+ Polifenoli come “diete ad alto contenuto di polifenoli”. Tale metodologia è resa possibile dal disegno fattoriale 2x2 dello studio che permette di valutare separatamente l’effetto dei polifenoli, degli acidi grassi omega 3 e della loro interazione.

Figura 8. Disegno dello studio



La differenza in polifenoli è stata ottenuta mediante la selezione di alimenti e bevande naturali presenti in commercio. Le maggiori fonti di polifenoli erano rappresentate da: carciofi, cipolle, rucola, spinaci, arance, succo di mirtillo, cioccolato fondente, caffè decaffeinato, tè decaffeinato e olio extra-vergine di oliva. (Tabella 8).

La composizione delle diete sperimentali è stata calcolata mediante il software MetaDieta (Meteda s.r.l., Ascoli-Piceno). I dati relativi al contenuto di polifenoli e l'indice ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) sono stati ottenuti da tabelle nutrizionali specifiche.[115] Il contenuto di polifenoli di tè, caffè, cioccolato e succo di mirtillo è stato misurato direttamente mediante il saggio di Folin-Ciocalteu.[116] Il fabbisogno energetico della dieta sperimentale è stato definito sulla base dell'introito energetico abituale individuale valutato mediante il diario alimentare (*7-day food record*) completato durante il run-in, e aggiustato per peso corporeo e giudizio clinico della dietista per evitare la possibile sottostima, comune nei soggetti in sovrappeso/obesi. Tutti i partecipanti hanno compilato il *7-day food record* a 4 e 8 settimane per valutare l'adesione al trattamento dietetico. L'adesione alle diete raccomandate è stata considerata adeguata se l'introito era almeno l'80% di quello raccomandato. Per aumentare l'adesione al trattamento, gli alimenti e le bevande sono stati forniti ai partecipanti per tutta la durata del protocollo sperimentale. I pasti che necessitavano una preparazione sono stati cucinati e confezionati da un servizio di catering qualificato, sotto la supervisione di una dietista. Inoltre, tutti i partecipanti sono stati contattati ogni settimana da una dietista per rinforzare la motivazione a proseguire correttamente lo studio. All'inizio e alla fine dello studio sono state rilevate le misure antropometriche, mediante metodiche standardizzate [94] e tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad un test da carico orale di glucosio (OGTT) della durata di 3 ore per la valutazione della tolleranza glicidica.

Inoltre, è stato valutato il profilo glico-lipidico a digiuno e dopo un pasto test (1000 kcal, Tabella 9). Il pasto test aveva una composizione nutrizionale che rispecchiava quella della dieta assegnata (Tabella 9).

A digiuno e ogni ora, per una durata totale di 6 ore, sono stati effettuati dei prelievi ematici per analizzare le concentrazioni di colesterolo e trigliceridi, nel plasma e nelle VLDL grandi). Inoltre, ai partecipanti è stato chiesto di raccogliere un campione di urina proveniente dalla raccolta delle 24 ore per il dosaggio dell'8-isoprostano, un marcatore di stress ossidativo, e per la valutazione dei metaboliti dei polifenoli come marcatori di *compliance* alla dieta.

Tabella 7. Composizione media della dieta assegnata e seguita nei gruppi sperimentali.

Composizione	Diete a basso contenuto di polifenoli			Diete a alto contenuto di polifenoli		
	Assegnata	Seguita [§]		Assegnata		
	Mean	Mean	SD	Mean	Mean	
Energia (kcal)	2500	2497	3	2500	2503	1
Proteine (%)	16	16	1	16	16	0.6
Grassi (%)	34	33	2	34	34	1
Colesterolo (mg)	195	188	29	187	192	20
Carboidrati (%)	51	51	2	51	50	2
Zuccheri (%)	20	20	1.3	20	20	1.3
Fibra (g)	29	27	4	28	27	2
Polifenoli totali (mg)	363	356	70	2868	272	328
Flavonoidi:						
Flavoni (mg)	2.3	2.4	0.6	7.6	267*	83
Flavonoli (mg)	6.4	6.4	0.9	223	197*	74
Flavan-3-oli (mg)	0.2	0.2	0.4	1194	1041*	262
Flavanoni (mg)	9.3	8.2	6	102	84*	32
Antocianidine (mg)	34	23	11	111	89*	45
Isoflavoni (mg)	0.0	0.0	0.0	0.02	0.02	0.0
Acidi fenolici (mg)	311	315	71	1245	1162*	224

§ Calcolata come media dei 7 day-food record compilati durante lo studio.

* $p < 0.001$ vs Diete a basso contenuto di polifenoli (ANOVA).

Tabella 8. Principali alimenti caratterizzanti le diete sperimentali.

Diete a basso contenuto di polifenoli	Diete a alto contenuto di polifenoli
Latte parzialmente scremato	Tè verde decaffeinato
Marmellata di arance	Marmellata di mirtili
Minestrone	Carciofi
Cavolfiore	Spinaci
Peperoni	Rucola
Zucca	Cipolle
Olio d'oliva	Olio EVO
Cioccolato bianco	Cioccolato fondente
Caffè decaffeinato n.1	Caffè decaffeinato n.7

EVO: olio extra-vergine di oliva

Tabella 9. Composizione del pasto test.

Caratteristiche	Diete a basso contenuto di polifenoli	Diete a alto contenuto di polifenoli
Energia (kcal)	998	998
Proteine (%)	12	12
Grassi (%)	57	57
SFA (%)	31	31
Carboidrati (%)	31	31
Polifenoli (mg)	50	770

Procedure di laboratorio. Le VLDL grandi (Sf 60-400) sono state isolate dal plasma mediante ultracentrifugazione per gradiente di densità discontinua, come precedentemente descritto.[117] Le HDL sono state isolate dal plasma mediante metodo di precipitazione con acido fosforotungstenico/cloruro di magnesio. Il colesterolo LDL è stato calcolato mediante la formula di Friedewald. Le concentrazioni di colesterolo, trigliceridi e glucosio sono state dosate con metodi enzimatici-colorimetrici standard (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germania) sull'autoanalizzatore Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia). Le concentrazioni di insulina (DIAsource ImmunoAssays S.A., Nivelles, Belgio) e GLP-1 (Merck-Millipore, Darmstadt, Germania) sono state analizzate con metodi ELISA automatizzati sull'autoanalizzatore Triturus (Grifols Italia SpA, Pisa,

Italia). Il dosaggio dell'8-isoprostano nelle urine è stato eseguito con un metodo immunoenzimatico manuale (Cayman EIA kit) e letto in spettrofotometria (DiaSorin EtiStar). Tutte le valutazioni sono state effettuate prima e dopo l'intervento di 8 settimane dal personale che non era a conoscenza del trattamento seguito dai partecipanti.

Calcoli. La risposta postprandiale al pasto o al carico orale di glucosio sono state valutate come area sotto la curva (tAUC) che è stata calcolata con il metodo trapezoidale. Inoltre, sono stati calcolati i seguenti indici OGTT-derivati:

- Insulino-sensibilità a digiuno, valutata con l'indice QUICKI (*quantitative insulin sensitivity check index*: $1/\log(\text{glicemia a digiuno, mg/dl}) + \log(\text{insulina a digiuno, mU/L})$).[118]
- Secrezione insulinica, valutata con l'indice HOMA- β (*homeostasis assessment method of the beta-cell*: $[(360 \text{ insulina} \cdot \text{digiuno, mU/L})/(\text{glicemia a digiuno, mg/dl} - 63)]$).[119]
- Secrezione precoce dell'insulina (tAUC insulina 0-30 minuti)
- Insulino-sensibilità post-carico, mediante l'indice OGIS (*oral glucose insulin sensitivity method*). [118]
- Secrezione insulinica post-carico, mediante l'indice di funzione β -cellulare (rapporto tAUC insulina/tAUC glucosio).[118]

Analisi statistica. Al fine di rilevare una differenza del 30% della tAUC dei trigliceridi nei chilomicroni e nelle VLDL larghe dopo un pasto ricco di grassi, tra i 4 trattamenti sperimentali, con una potenza di 80% al 5% livello di significatività, dovevano essere reclutati 80 pazienti. Tale differenza è clinicamente rilevante e corrisponde alla differenza osservata tra i pazienti affetti da diabete tipo 2 e controlli sani in uno studio precedente. I risultati dello studio sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{deviazione standard (SD)}$, se non

diversamente specificato. Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo la trasformazione logaritmica. I dati sono stati analizzati per *intention to treat* in tutti i soggetti che hanno completato lo studio. Un'analisi *per protocol* avrebbe comunque prodotto gli stessi risultati perché tutti i partecipanti erano complianti al trattamento. Le differenze tra i quattro gruppi al basale sono state testate con l'ANOVA (Analisi della Varianza) e l'analisi *post-hoc* (LSD). Gli effetti di polifenoli, acidi grassi $\omega 3$ e della loro interazione, sono stati valutati con l'ANOVA a due fattori prendendo in considerazione le variazioni assolute osservate (valori a 8 settimane – valori basali) aggiustate utilizzando i valori basali come covariata. Infine, gli effetti dei trattamenti dietetici sui profili postprandiali (OGTT, pasto test) sono stati valutati in con un modello lineare generale per misure ripetute.

Al fine di questa analisi secondaria, sono stati presi in considerazione i principali risultati clinici beneficiari di polifenoli (i trigliceridi postprandiali nel plasma e il grande VLDL, il colesterolo postprandiale nella grande VLDL, la risposta alla glucosio post-carico di glucosio (OGTT), la secrezione precoce dell'insulina e gli isoprostani urinari come marcatori di lo stress ossidativo).

Le associazioni tra le sottoclassi di polifenoli (acidi fenolici, flavonoidi, antocianidine, flavoni, flavan-3-ol, flavonoli e flavanoni) e le variabili dello studio sono state valutate mediante correlazione di Spearman. Successivamente, le correlazioni sono state aggiustate per gli effetti di sesso, età e indice di massa corporea (BMI) usando un modello lineare generalizzato per l'analisi univariate. Infine, è stata utilizzata un'analisi di regressione lineare, eseguita con un modello *stepwise*, per identificare la classe di polifenoli più correlata all'effetto sul parametro ematochimico (utilizzato come variabile dipendente).

L'analisi statistica è stata eseguita secondo i metodi standard mediante il software Statistical Package for Social Sciences versione 21.0 (SPSS/PC; SPSS, Chicago, IL, USA).

Risultati

Poiché l'analisi statistica non ha evidenziato nessun effetto significativo degli acidi grassi omega 3 o della loro interazione, i risultati dello studio degli *outcome* metabolici saranno presentati raggruppando le diete a basso contenuto di polifenoli (Dieta Controllo e Dieta Omega-3) e le diete ad alto contenuto di polifenoli (Dieta Polifenoli e Dieta Omega-3 + Polifenoli).

Caratteristiche dei partecipanti. Settantotto soggetti hanno completato lo studio (diete a basso contenuto di polifenoli n=39 e diete ad alto contenuto di polifenoli n=39) e sono stati inclusi nell'analisi. Al basale, i partecipanti assegnati ai gruppi sperimentali erano sovrapponibili per età, peso corporeo, BMI, pressione arteriosa, concentrazioni plasmatiche di lipidi, glucosio, insulina, GLP-1 e insulino-sensibilità valutata con l'indice QUICKI. Inoltre, 25 partecipanti avevano alterata glicemia a digiuno (IFG) (diete a basso contenuto di polifenoli n=11 e diete ad alto contenuto di polifenoli n=14); 8 partecipanti avevano una ridotta tolleranza al glucosio (IGT) (diete a basso contenuto di polifenoli n=5 e diete ad alto contenuto di polifenoli n=3); 18 partecipanti hanno avuto IFG + IGT (diete a basso contenuto di polifenoli n=9 e diete ad alto contenuto di polifenoli n=9). Il peso corporeo è stato relativamente stabile durante l'intervento, con piccole riduzioni a 8 settimane (diete a basso contenuto di polifenoli: -0.62 ± 0.98 kg e diete ad alto contenuto di polifenoli: -0.44 ± 0.72 kg). La circonferenza vita non è cambiata significativamente durante l'intervento (diete a basso contenuto di polifenoli: -0.95 ± 1.4 cm e diete ad alto contenuto di polifenoli: Dieta Polifenoli: -0.90 ± 1.5 cm).

Adesione al trattamento dietetico. L'adesione al trattamento dietetico è stata ottimale in tutti i gruppi sperimentali (Tabella 7). Come atteso, le diete erano differenti esclusivamente per l'indice ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) e il contenuto di polifenoli.

Nessuna differenza è stata riscontrata per macronutrienti, fibre e contenuto di vitamine. Tutti i soggetti erano nei limiti di assunzione definiti per una buona adesione per ciascun componente alimentare.

Metabolismo lipidico - Lipidi e lipoproteine a digiuno. Dopo 8 settimane le diete ricche in polifenoli è stata osservata una riduzione significativa dei trigliceridi a digiuno ($p=0.0023$). Le concentrazioni di colesterolo totale e la frazione LDL non sono state influenzate in maniera significativa dai diversi interventi dietetici. Per quanto riguarda le concentrazioni dei lipidi nelle VLDL grandi e nelle HDL, è stata riscontrata una riduzione significativa sia dei trigliceridi che del colesterolo per effetto dei polifenoli (Tabella 10).

Tabella 10. Variazioni assolute di colesterolo, trigliceridi e indici di tolleranza glicidica a digiuno.

Parametri	Diete a basso contenuto di polifenoli	Diete a alto contenuto di polifenoli	<i>p value</i>*
Plasma (mg/dl)			
-Trigliceridi	5.0±52	-16±36	0.023
-Colesterolo	-5.0±22	-5.0±22	0.859
VLDL grandi (mg/dl)			
-Trigliceridi	-1.1±35	-14±26	0.016
-Colesterolo	-0.1±6.5	2.0±4.9	0.045
HDL (mg/dl)			
-Trigliceridi	0.2±5.8	-3.1±5.2	0.017
-Colesterolo	0.1±3.9	3.0±4.8	0.005
LDL-Colesterolo (mg/dl)	-3.1±15	-0.6±17	0.088
Glicemia (mg/dl)	104±12	102±10	0.882
Insulina ($\mu U/ml$)	18±6.0	19±6.0	0.449
QUICKI	0.001±0.003	-0.002±0.005	0.804
HOMA- β (%)	-12±8.5	-3.26±11	0.979

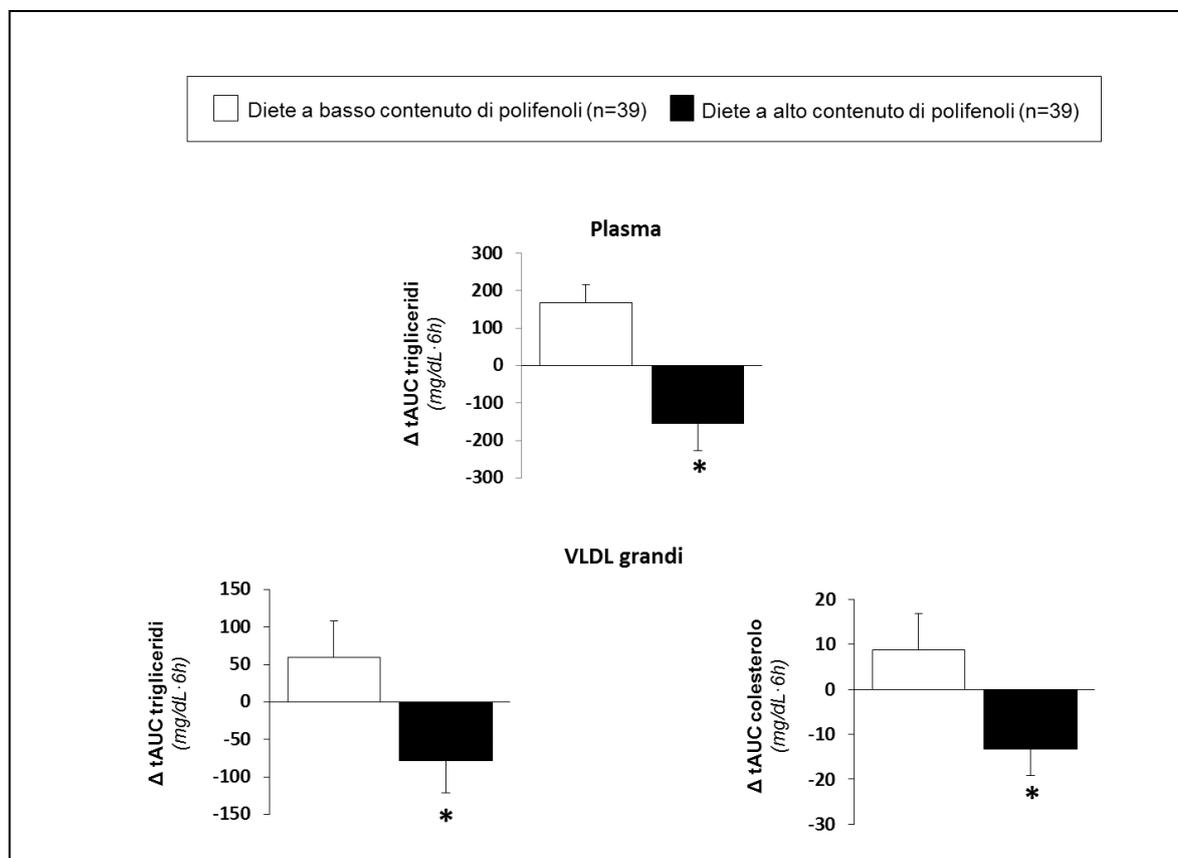
*effetto dei polifenoli (ANOVA a 2 fattori).

Metabolismo Lipidico - Lipidi e lipoproteine nel periodo postprandiale. Le variazioni assolute (8 settimane meno basale) della risposta postprandiale dei lipidi osservate dopo l'intervento sono mostrati in Figura 9. Dopo 8 settimane di trattamento nutrizionale, è stata osservata una riduzione statisticamente significativa della tAUC dei trigliceridi plasmatici

dopo il pasto per effetto dei polifenoli ($p=0.041$; figura 9). La tAUC del colesterolo totale del plasma non si è modificata in modo significativo con nessuna delle diete sperimentali (dati non riportati). Nelle VLDL grandi sia la tAUC dei trigliceridi che quella del colesterolo diminuivano nei gruppi assegnati alle diete ricche in polifenoli ($p=0.004$ e $p=0.013$, per trigliceridi ed colesterolo, rispettivamente; figura 9).

Stress ossidativo. Al basale, non sono state osservate differenze nelle concentrazioni urinarie di 8-isoprostano (diete a basso contenuto di polifenoli: 1106 ± 480 ng/24h e diete ad alto contenuto di polifenoli: 1409 ± 706 ng/24h). Dopo 8 settimane, le concentrazioni di 8-isoprostano diminuivano nei gruppi assegnati alle diete ricche in polifenoli ($p=0.012$ ANOVA a due fattori; figura 10).

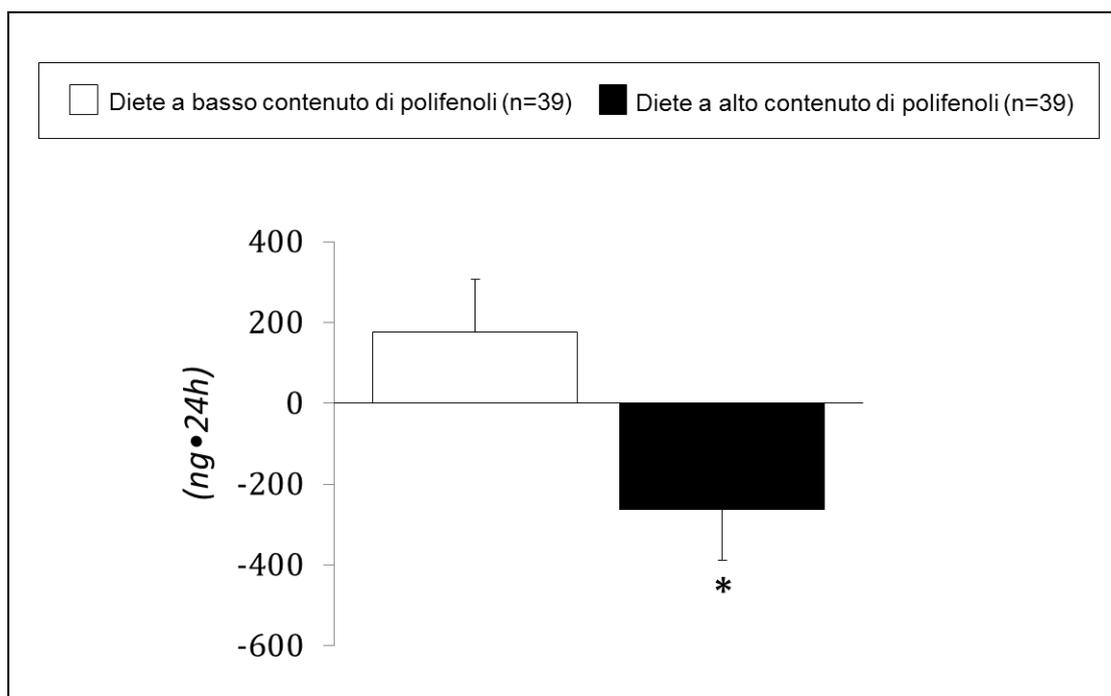
Figura 9. Variazioni assolute della risposta lipidica postprandiale nel plasma e nelle VLDL grandi.



I dati sono espressi come $M \pm SEM$.

* $p < 0.05$ per effetto dei polifenoli (ANOVA a due fattori)

Figura 10. Variazioni assolute della concentrazione urinaria di 8-isoprostano.



I dati sono espressi come $M \pm SEM$.

* $p < 0.05$ per effetto dei polifenoli (ANOVA a due fattori)

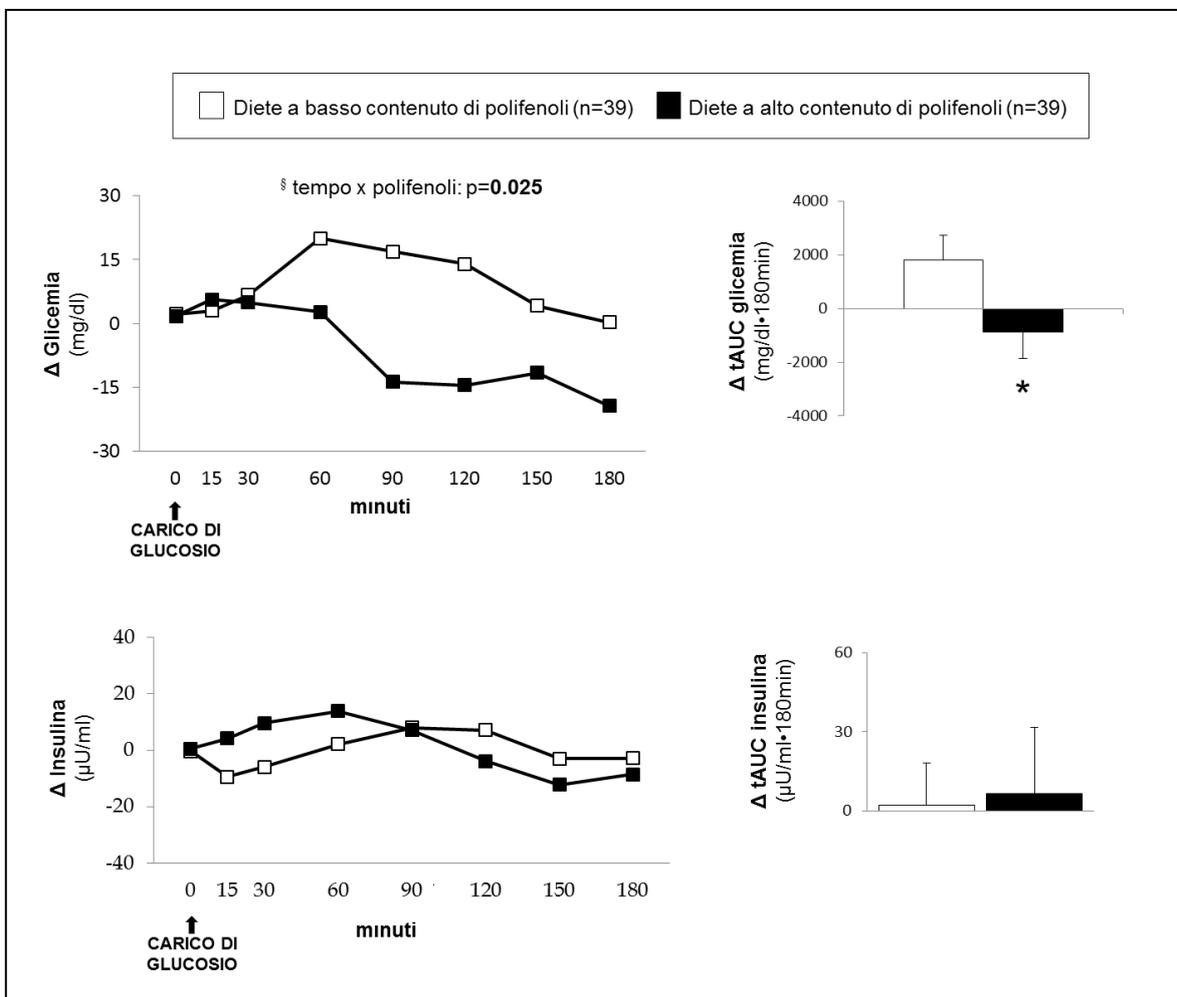
Metabolismo glicidico (OGTT) - Glicemia, insulina e indici a digiuno. L'intervento di 8 settimane non ha indotto alcuna variazione significativa delle concentrazioni plasmatiche di glucosio e di insulina e degli indici di insulino-sensibilità e capacità di secrezione insulinica (tabella 10).

Metabolismo glicidico (OGTT) - Glicemia, insulina e indici derivati. Dopo 8 settimane di intervento, le variazioni assolute della glicemia e dell'insulina dopo carico di glucosio sono riportati in Figura 4, sia come singoli punti temporali sia come tAUC. La risposta glicemica diminuiva in modo significativo per effetto dei polifenoli ($p=0.036$ ANOVA a due fattori). Per quanto riguarda la variazione assoluta dell'insulina plasmatica, nessuna differenza significativa è stata riscontrata, sia come singoli punti temporali sia come tAUC, tra i gruppi sperimentali (Figura 10).

Tuttavia, prendendo in considerazione la fase precoce della secrezione di insulina (tAUC 0-30 minuti; Figura 11), è stato riscontrato un aumento nei gruppi che seguivano le diete ricche in polifenoli ($p=0.048$).

Gli indici OGTT-derivati sono mostrati in Figura 11. Nessun effetto significativo è stato osservato sulle variazioni assolute della funzione β -cellulare e della sensibilità insulinica, valutata mediante indice OGIS, sebbene un aumento di tali parametri sia stato osservato nei gruppi che seguivano le diete ricche in polifenoli.

Figura 10. Variazioni assolute della glicemia e dell'insulina durante l'OGTT.

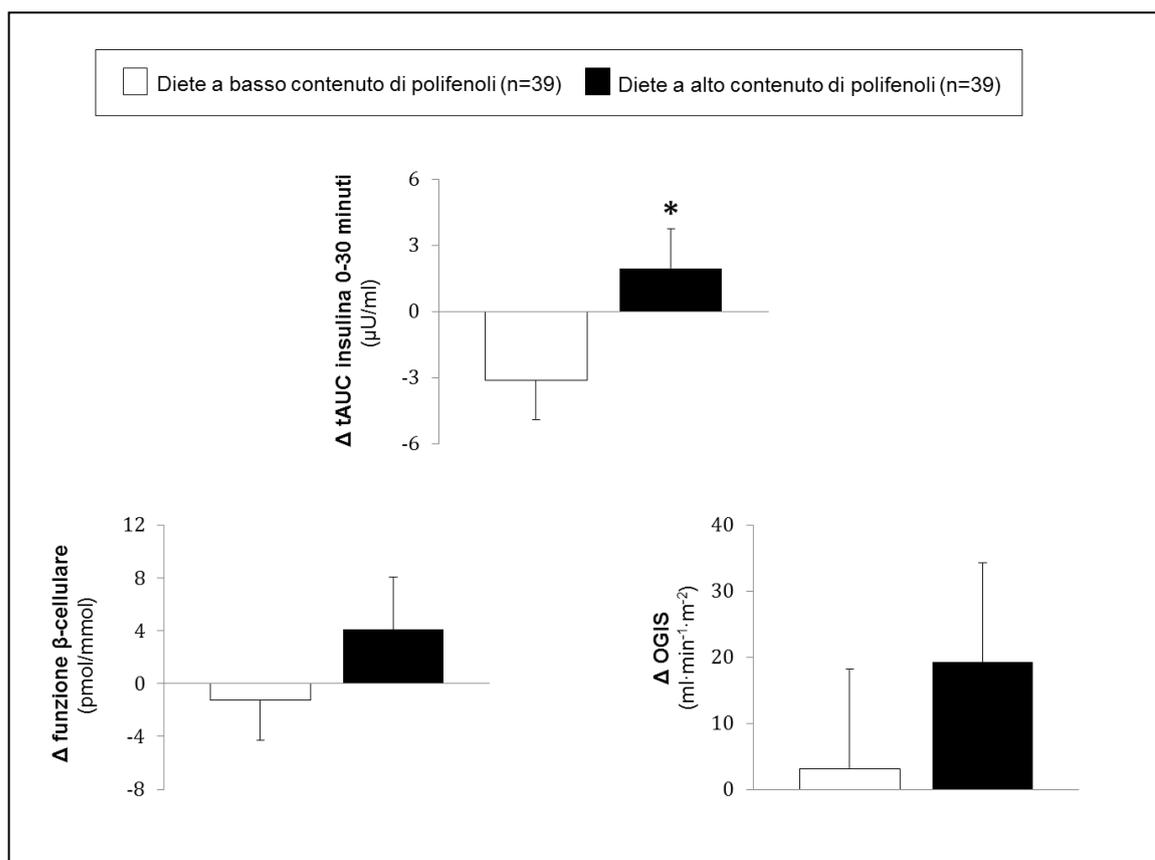


I dati sono espressi come $M \pm SEM$.

§ Modello Lineare Generalizzato per misure ripetute.

* $p < 0.05$ per effetto dei polifenoli (ANOVA a due fattori)

Figura 11. Variazioni assolute della secrezione precoce dell'insulina, della funzione β -cellulare e dell'indice OGIS durante l'OGTT.



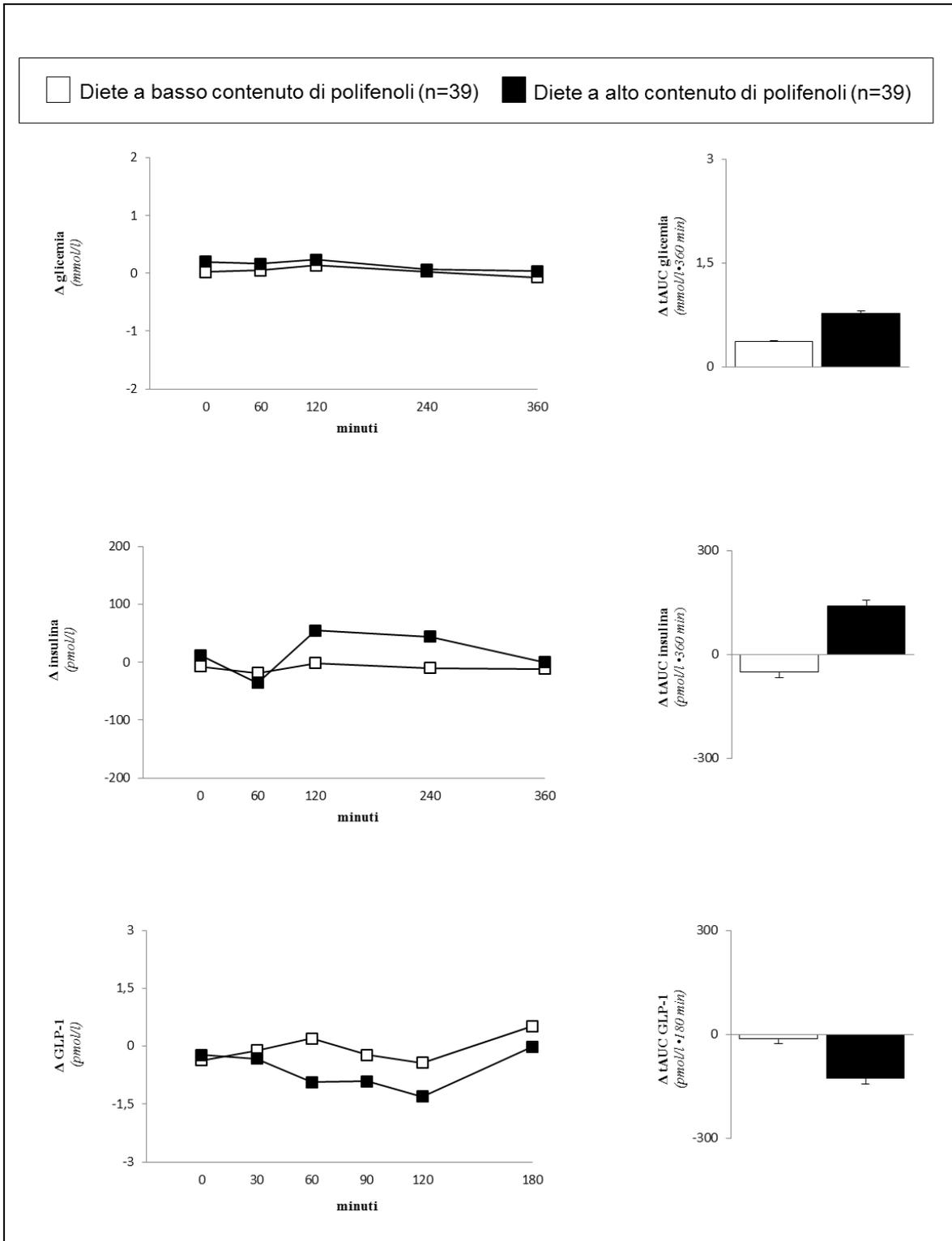
I dati sono espressi come $M \pm \text{SEM}$.

* $p < 0.05$ per effetto dei polifenoli (ANOVA a due fattori)

Metabolismo glicidico (Pasto test). Le variazioni assolute di glicemia, insulina e GLP-1 osservate dopo 8 settimane di intervento sono mostrate in figura 12, sia come singoli punti temporali che come tAUC dopo il pasto test.

Nessun effetto significativo dei polifenoli è stato osservato sulla risposta glicemica e insulinemica o sulle concentrazioni di GLP-1 nel periodo postprandiale, sia come profilo che come tAUC (Figura 12).

Figura 12. Variazioni assolute della glicemia, dell'insulina e del GLP-1 durante il pasto test.



I dati sono espressi come $M \pm SEM$.

Analisi di correlazione. L'analisi di correlazione è stata effettuata prendendo in considerazione le singole classi di polifenoli introdotte con la dieta e i principali *outcome* clinici migliorati per effetto dei polifenoli (risposta postprandiale dei trigliceridi nel plasma e nelle VLDL grandi, risposta postprandiale del colesterolo nelle VLDL grandi, la risposta glicemica all'OGTT, la secrezione precoce dell'insulina e gli isoprostani urinari come marcatori dello stress ossidativo).

L'associazione bivariata non corretta ha mostrato che la riduzione della risposta lipidica postprandiale nel plasma (AUC dei trigliceridi) e nelle VLDL grandi (AUC trigliceridi e AUC del colesterolo) era inversamente correlata con l'aumento di ciascuna sottoclasse di polifenoli, anche se solo la variazione dei flavanoni raggiungeva la significatività statistica (Tabella 11).

Per quanto riguarda il miglioramento della risposta glicemica all'OGTT, solo l'associazione inversa con l'aumento dell'*intake* di flavoni era altamente significativa, mentre le correlazioni rilevate per le altre classi di polifenoli avevano la stessa tendenza ma non raggiungevano significatività statistica (Tabella 11).

Le variazioni della secrezione precoce dell'insulina erano associati positivamente alla variazione dei flavonoidi, in particolare con le antocianidine e i flavan-3-oli (Tabella 11).

Infine, la riduzione degli isoprostani urinari osservata dopo le diete ad alto contenuto di polifenoli era fortemente correlata con le variazioni di flavonoidi, in particolare con antocianidine, flavan-3-oli e flavonoli (Tabella 11).

Tutte queste associazioni rilevate con la correlazione bivariata non perdevano la significatività statistica se correte per sesso, età e BMI (Tabella 11).

I risultati dell'analisi di regressione lineare, eseguiti con un modello *stepwise*, hanno mostrato che le variazioni di flavonoli erano indipendentemente associate alla riduzione degli isoprostani urinari (β : -0.305, p : 0.010), mentre l'incremento della secrezione precoce di insulina era principalmente associato ai flavan -3-oli (β : 0,742, p <0,001).

Tabella 11. Correlazioni bivariate di Spearman tra le variazioni assolute[§] delle sottoclassi di polifenoli e i principali *outcome* dello studi.[†]

<i>Outcome</i> clinici	Acidi fenolici	Flavonoidi	Antocianidine	Flavoni	Flavan-3-oli	Flavonoli	Flavanoni
	r	r	r	r	r	r	r
Risposta lipidica							
AUC TG plasma (mg/dl*6h)	- 0.128	- 0.202	- 0.167	- 0.081	- 0.191	- 0.203	- 0.251**
AUC TG VLDL grandi (mg/dl*6h)	- 0.189	- 0.229	- 0.112	- 0.095	- 0.200	- 0.218	- 0.253*
AUC COL VLDL grandi (mg/dl*6h)	- 0.229	- 0.204	- 0.117	- 0.097	- 0.226	- 0.215	- 0.274*
Tolleranza glicidica							
AUC glicemia (mg/dl*3h)	- 0.119	- 0.218	- 0.119	- 0.305**	- 0.215	- 0.202	- 0.181
AUC precoce insulina (μU/ml*30 min)	- 0.033	0.258*	0.300*	0.222	0.258*	0.157	0.224
Stress ossidativo							
Isoprostani urinari (ng*24h)	- 0.188	- 0.134**	- 0.309**	- 0.055	- 0.313**	- 0.312**	- 0.196

[§] calcolata come calore a 8 settimane – valore basale.

*p<0.05; **p<0.01 con correlazione di Spearman.

[†] L'aggiustamento per età, sesso e BMI non ha modificato la significatività delle correlazioni.

AUC: area sotto la curva calcolata con il metodo trapezoidale (l'AUC è stata usata per esprimere la risposta al pasto test/OGTT), COL: colesterolo, TG: trigliceridi.

Discussione

I risultati principali e più rilevanti dello studio di intervento sono che una dieta naturalmente ricca di polifenoli, (1) riduce la trigliceridemia, soprattutto nella frazione delle VLDL grandi, a digiuno e in fase postprandiale, (2) diminuisce lo stress ossidativo e (3) migliora la tolleranza glicidica in soggetti ad alto rischio di sviluppare malattie cardiovascolari e diabete.

Le evidenze ad oggi presenti in letteratura sul ruolo dei polifenoli sul metabolismo glicolipidico derivano soprattutto da studi *in vitro* e sugli animali [62]; i pochi studi condotti nell'uomo hanno utilizzato una singola fonte di polifenoli oppure estratti di un singolo composto fenolico testando, quindi, dosi farmacologiche difficilmente raggiungibili con l'alimentazione abituale. Inoltre, tali studi, forniscono spesso risultati contrastanti. In particolare, per quanto riguarda gli effetti dei polifenoli sul metabolismo lipidico, alcuni studi mostrano solo una tendenza al miglioramento della colesterolemia nella frazione LDL e HDL; inoltre, i dati sul metabolismo dei trigliceridi sono estremamente divergenti [120] e sono molto pochi gli studi che hanno valutato l'effetto dei polifenoli sul metabolismo lipidico postprandiale.[121]

Nello studio, sono diversi i potenziali siti di azione su cui i polifenoli possono agire influenzando il metabolismo lipidico; in particolare, i polifenoli potrebbero aver indotto una riduzione dell'assorbimento dei trigliceridi, con conseguente diminuzione della circolazione di lipoproteine ricche in trigliceridi e, eventualmente, lipoproteine *remnant*. [62] Altri possibili meccanismi includono un aumento del dispendio energetico, riduzione lipogenesi, massa grassa ridotta, infiammazione ridotta, e la riduzione dello stress ossidativo.[122] A tal proposito, nello studio abbiamo osservato una riduzione di circa il 20% della concentrazione urinaria di 8-isoprostano, un indicatore biologico affidabile di ossidazione, per effetto dei polifenoli. La riduzione dello stress ossidativo

potrebbe influenzare il metabolismo lipidico aumentando l'attività degli enzimi coinvolti nell'ossidazione dei grassi nel fegato, o diminuendo l'assorbimento dei nutrienti.[123] Tuttavia, non è da escludere che il miglioramento del metabolismo lipidico a digiuno e, soprattutto, in fase postprandiale potrebbe aver indotto la riduzione dello stress ossidativo. Un risultato inaspettato di questo studio è la riduzione del colesterolo e dei trigliceridi nelle HDL osservato dopo l'assunzione di diete ricche in polifenoli. Il significato di questa riduzione in termini di rischio cardiovascolare è sconosciuta. I risultati relativi alla tolleranza glicidica mostrano un miglioramento del metabolismo del glucosio durante l'OGTT e quindi in assenza di effetto acuto dei polifenoli. Ciò suggerisce che l'assunzione cronica di polifenoli induce modifiche del metabolismo e dell'espressione di geni coinvolti nella regolazione del metabolismo del glucosio. In particolare, la diminuzione delle concentrazioni di glucosio nel plasma osservate durante l'OGTT era associato con un miglioramento della prima fase della secrezione di insulina. Inoltre, come dimostrato da indici OGTT-derivati, i polifenoli alimentari tendevano a migliorare anche la sensibilità all'insulina post-carico.

Prove da diversi studi *in vitro* e sugli animali supportano i meccanismi d'azione benefica dei polifenoli sul metabolismo del glucosio osservata nel nostro studio. Infatti, varie classi di polifenoli sono stati in grado di migliorare la secrezione di insulina attraverso meccanismi dipendenti [124] e indipendenti [125] dal glucosio e stimolando la proliferazione delle cellule beta.[126] Inoltre, alcuni studi hanno anche dimostrato che i polifenoli potrebbero migliorare l'assorbimento del glucosio dai tessuti periferici che influenzano direttamente l'azione di geni chiave come il PPAR-gamma e la traslocazione del trasportatore di glucosio-GLUT-4, come mostrato in adipociti in coltura.[127]

In questo studio di intervento, l'uso di diverse classi di polifenoli, ciascuno con un possibile meccanismo di azione diverso sul metabolismo del glucosio, può spiegare l'influenza simultanea su diversi meccanismi, la secrezione di insulina prima fase e la

sensibilità all'insulina con conseguente effetto additivo e chiaramente benefico sulla tolleranza al glucosio.

Un punto di forza dello studio è che le diete sperimentali differivano esclusivamente per contenuto di polifenoli mentre erano sovrapponibili per contenuto di macro e micronutrienti, fattori che avrebbero potuto influenzare gli effetti studiati. Inoltre, gli effetti osservati nello studio non erano mediati da variazioni del peso corporeo o modifiche dell'appetito, come suggerito per le catechine, o per lo più legati agli effetti adrenergici della caffeina.[128] Infatti, il peso corporeo è rimasto invariato durante il protocollo sperimentale, e la presenza di caffeina era trascurabile perché sono stati impiegati caffè e tè decaffeinato. Pertanto, possiamo affermare con sicurezza che il miglioramento degli *outcome* da noi valutati è legata principalmente alla maggiore assunzione di polifenoli.[129]

Un altro punto di forza è che la quantità di polifenoli utilizzate nel nostro studio è più elevata rispetto alla quantità generalmente consumata nelle diete occidentali (1g/die), ma facilmente raggiungibile con cibi naturali, tipici della maggior parte delle abitudini gastronomiche e senza alcun tipo di supplemento. Inoltre, l'ottima aderenza dei partecipanti mostra che questo tipo di dieta è fattibile e facilmente accettabile. Un ulteriore punto di forza del nostro studio controllato è stato che le diete sperimentali esclusivamente per contenuto di polifenoli e non di altri composti bioattivi.

Un limite di questo studio è che i risultati si riferiscono a soggetti caratterizzati da un alto rischio cardiometabolico; quindi, non sappiamo se gli stessi risultati possono essere applicati anche ad una popolazione senza alterazioni metaboliche o con stadi più avanzati di malattia metabolica o cardiovascolare.

I risultati di questo studio sono importanti perché le alterazioni del metabolismo glicolipidico a digiuno e in fase postprandiale rappresentano dei fattori di rischio cardiovascolare indipendente. La dieta è l'approccio più naturale per alterazioni

postprandiali e, grazie alla sua azione pleiotropica, può esplicare effetti benefici multipli. Lo stress ossidativo è uno dei possibili meccanismi coinvolti nella patogenesi delle principali malattie degenerative croniche. La possibilità di agire favorevolmente questo meccanismo con una dieta naturalmente ricca di differenti polifenoli è clinicamente rilevante.

In conclusione, questo studio randomizzato e controllato fornisce la prova che le diete naturalmente ricche in polifenoli riducono la trigliceridemia postprandiale e lo stress ossidativo; inoltre, migliorano la tolleranza glicidica, riducendo la glicemia, aumentando la secrezione precoce dell'insulina e l'insulino-sensibilità periferica.

Questi effetti possono contribuire a spiegare l'associazione favorevole tra l'assunzione di polifenoli con la dieta e la riduzione del rischio di diabete e malattia cardiovascolare.

6.3 Progetto AMILOSIO

Background

I carboidrati rappresentano la principale fonte di energia nell'uomo e soddisfano il 45-70% delle necessità metaboliche dell'organismo. I cereali sono la fonte alimentare di carboidrati più utilizzata ed, inoltre, contribuiscono significativamente al tenore proteico della dieta.

I carboidrati derivanti dai cereali sono rappresentati in larga parte da amido, un polimero del glucosio formato da due diverse unità: l'amilopectina e l'amilosio, con un rapporto 3:1, rispettivamente. Queste due unità differiscono per la struttura chimica in quanto l'amilosio presenta una struttura lineare mentre l'amilopectina è caratterizzata da numerose ramificazioni. La differenza strutturale di queste due unità polimeriche influenza le caratteristiche chimiche e la funzionalità dell'amido.[130] Di conseguenza, la proporzione di amilopectina e amilosio all'interno dell'amido ha importanti ripercussioni sui processi tecnologici dell'industria alimentare.[131-133]

Inoltre, numerose evidenze scientifiche mostrano che il rapporto amilosio/amilopectina può avere importanti effetti su parametri biologici rilevanti per la prevenzione delle malattie metaboliche. Infatti, è stato dimostrato che aumentate concentrazioni di glicemia, insulina e lipidi nel periodo postprandiale rappresentano importanti fattori di rischio cardiometabolico.[134]

I carboidrati che maggiormente influenzano la glicemia postprandiale sono quelli che vengono digeriti rapidamente, poiché causano un aumento repentino delle concentrazioni ematiche di glucosio. Tale effetto, quindi, potrebbe essere minimizzato mediante l'ingestione di carboidrati che vengono digeriti e assorbiti più lentamente.

Rispetto a tali considerazioni, la tipologia di amido ingerito con la dieta ha notevole rilevanza; infatti, nel duodeno, l'amilosio è digerito lentamente dall' α -amilasi, l'enzima

deputato alla scissione dei legami tra le subunità di glucosio presenti nella struttura chimica dei polimeri. Al contrario, l'amilopectina è digerita molto rapidamente poiché le ramificazioni caratteristiche della sua struttura chimica forniscono numerosi punti di attacco per l'azione dell' α -amilasi.

In secondo luogo, l'amilosio ha una conformazione strutturale a doppia elica e presenta il sito di azione per l' α -amilasi nella parte più interna della sua struttura rendendolo meno accessibile.[135]

Inoltre, la propensione alla retrogradazione (cioè la tendenza dell'amilosio a riassumere la struttura originaria) che rende l'amido più resistente alla digestione e le proprietà dei granuli di amido (grandezza, dimensione, cristallinità, contenuto di lipidi, proteine e fosfati), contribuisce al rallentamento dell'assorbimento del glucosio, riducendo la glicemia postprandiale, e quindi il fabbisogno di insulina.[136]

Tali caratteristiche dell'amilosio hanno incrementato la ricerca di varietà di grano a più alto contenuto di amilosio per la produzione di prodotti a base di cereali che inducono una risposta glicemica più bassa.[134,137]

Negli ultimi anni, utilizzando tecniche tradizionali di ibridazione rigorosamente senza utilizzo di tecniche per la produzione di organismi geneticamente modificati (OGM), sono state generate delle linee di grano tenero e duro che presentano un contenuto di amilosio maggiore rispetto alle comuni varietà attualmente utilizzate.

Le farine ottenute da queste nuove varietà di grano potrebbero essere utilizzate per la creazione di prodotti da forno con un elevato contenuto di amilosio rispetto al frumento comunemente utilizzato che ne contiene meno del 30%.

Sulla base di queste considerazioni è ragionevole ipotizzare che i prodotti da forno a base di farina ricca di amilosio possono avere effetti su glicemia, insulina e lipidi nel periodo postprandiale rispetto ai normali prodotti da forno a base di farine ricche di amilopectina.

Scopo

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare in acuto se il consumo di fette biscottate prodotte con una farina ricca di amilosio può indurre una ridotta risposta glicolipidica e aumentare il senso di sazietà rispetto a fette biscottate convenzionali prodotte con una farina ricca di amilopectina, in un gruppo di volontari a lieve rischio cardiometabolico.

Materiali e metodi

Partecipanti. Sono stati reclutati volontari in sovrappeso/obesi (indice di massa corporea 25-30 kg/m²) di entrambi i sessi con un'età compresa tra i 30 e 60 anni.

Sono stati esclusi i soggetti affetti dalle seguenti patologie: diabete o ridotta tolleranza glicidica, alterazioni del metabolismo lipidico o in terapia con farmaci ipolipemizzanti, cardiopatia grave, insufficienza renale ed epatopatia, anemia e qualsiasi altra malattia cronico degenerativa.

Tutti i partecipanti hanno firmato il consenso informato prima di essere inclusi nello studio. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e registrato su ClinicalTrials.gov, numero identificativo NCT02702934.

Disegno dello studio. Lo studio è stato condotto secondo un disegno sperimentale in crossover (figura 13). I partecipanti hanno assunto in ordine del tutto casuale due pasti standard a distanza di almeno una settimana l'uno dall'altro. La randomizzazione è stata effettuata mediante una lista di assegnazione casuale computerizzata. I due pasti standard avevano lo stesso contenuto energetico e la stessa composizione in nutrienti; l'unica

differenza era rappresentata dalla fonte di carboidrati consumata: fette biscottate prodotte utilizzando una farina ricca di amilosio (pasto test) o una farina ricca in amilopectina (pasto controllo) (tabella 12).

Poiché le fette biscottate prodotte utilizzando una farina ricca di amilosio (test) contenevano una maggiore quantità di fibre alimentari (13,9 vs. 7,7 g /100g, test e controllo, rispettivamente), 20 g di crusca in polvere (Albios Giuliani, Italia) sono stati aggiunti al pasto controllo per ottenere la stessa quantità di fibra alimentare nei due pasti standard.

Il giorno del test sono stati prelevati dei campioni di sangue a digiuno e fino a 4 ore dopo il consumo del pasto standard per le determinazioni previste dal protocollo sperimentale (glucosio, insulina, trigliceridi, FFA, GLP-1 e Grelina).

Inoltre, sono stati valutate le sensazioni soggettive relative all'appetito (fame, sazietà, prospettiva di consumo di cibo e desiderio di mangiare) mediante *Visual Analogue Scale* (VAS, [138]) e la fermentazione intestinale mediante *breath* test (Gastro+ Gastrolyzer®, Bedford Scientific Ltd. [139]) (figura 14).

I partecipanti sono stati sottoposti ad un 24h-recall per la valutazione del consumo di alimenti e bevande nel giorno precedente al test. Infatti, tutti i soggetti sono esortati a standardizzare la cena del giorno precedente al test e di evitare il consumo di cibi ricchi in fibra (legumi e cereali integrali), bevande alcoliche, cibi contenenti probiotici e di praticare attività fisica intensa.

Figura 13. Disegno dello studio.

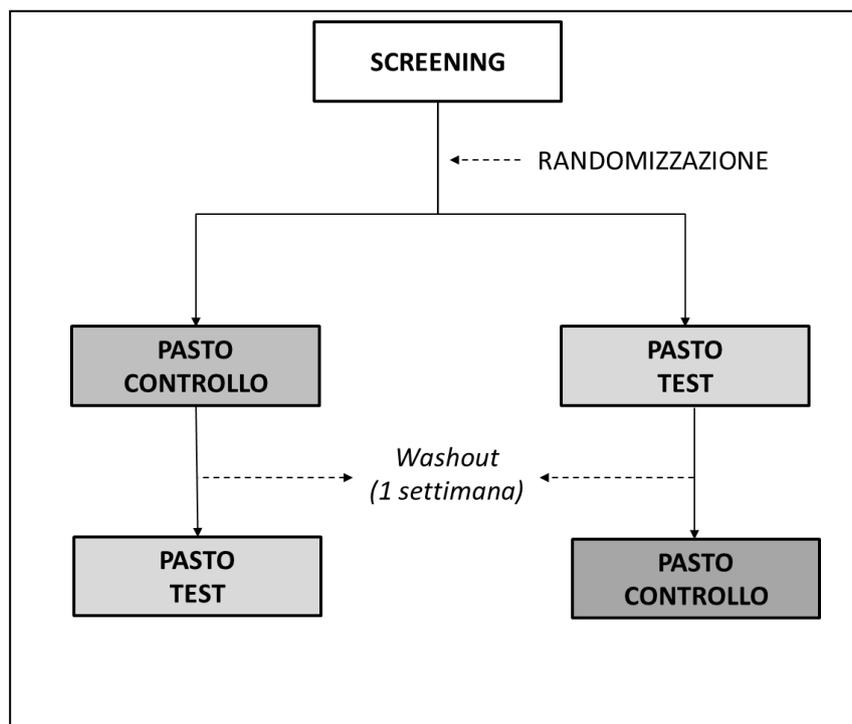
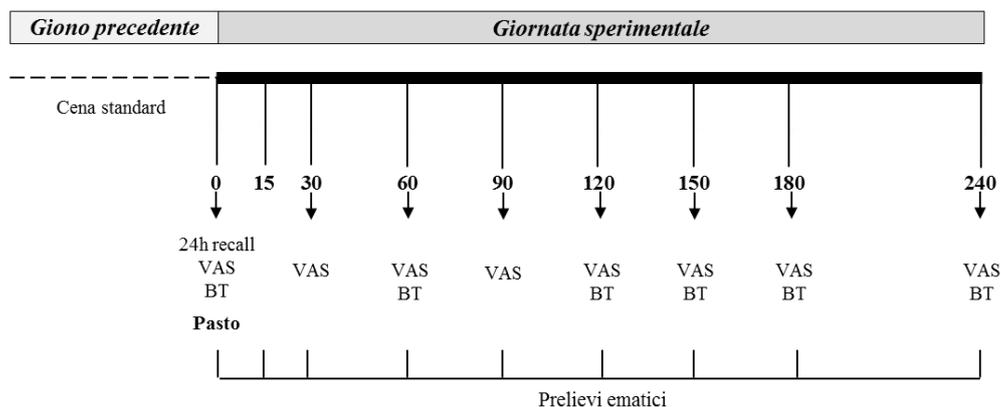


Tabella. Composizione dei due pasti standard

Caratteristiche	Pasto controllo	Pasto test
Alimenti	117 gr di f.b controllo	130 gr di f.b ricco in amilosio
	40 gr prosciutto	40 gr prosciutto
	250 gr pomodori	250 gr pomodori
	27 ml olio EVO	28 ml olio EVO
	20 gr di crusca	
	100 ml latte delattosato	100 ml latte delattosato
	90 ml succo d'arancia	100 ml succo d'arancia
	150 ml Acqua	150 ml Acqua
Energia (kcal)	901	883
Proteine (g)	36	35
Grassi (g)	36	37
SFA (g)	6	7
Carboidrati disponibili (g)	104	101
Amido resistente (g)	-	7
Fibra (g/die)	20	21

EVO: extra-vergine di oliva, SFA: acidi grassi saturi. fb fette biscottate

Figura 14. Procedure sperimentali.



Procedure di laboratorio. Le concentrazioni di trigliceridi e glucosio sono state dosate con metodi enzimatici-colorimetrici standard (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germania) sull'autoanalizzatore Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia). Specifici metodi immunoenzimatici sono stati utilizzati per il dosaggio di insulina (DIAsource ImmunoAssays S.A., Nivelles, Belgio), GLP-1 (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) e Grelina (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) automatizzati sull'autoanalizzatore Triturus (Grifols Italia SpA, Pisa, Italia).

Calcoli. Le risposte postprandiali sono state valutate come area sotto la curva al di sopra/al di sotto del valore a digiuno (incrementale / decrementale iAUC) calcolata con il metodo trapezoidale.

Inoltre, sono stati calcolati i seguenti indici derivati:

- indice di sensibilità all'insulina (ISI), calcolato come parametro ISIcomp secondo il metodo di Matsuda et al. [140]
- assorbimento intestinale di glucosio durante il pasto, calcolato mediante un appropriato modello matematico. [141]
- cinetica degli FFA. [142]

Analisi statistica. I risultati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$, salvo diversa indicazione. Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo la trasformazione logaritmica o espresse come incremento/decremento assoluto, calcolato sottraendo il valore di digiuno da quello di ogni punto temporale della curva.

Le differenze tra i due pasti sperimentali sono state valutate mediante *t-test* di Student per campioni appaiati. L'analisi statistica è stata eseguita secondo i metodi standard mediante il software Statistical Package for Social Sciences versione 21.0 (SPSS/PC; SPSS, Chicago, IL, USA).

Risultati

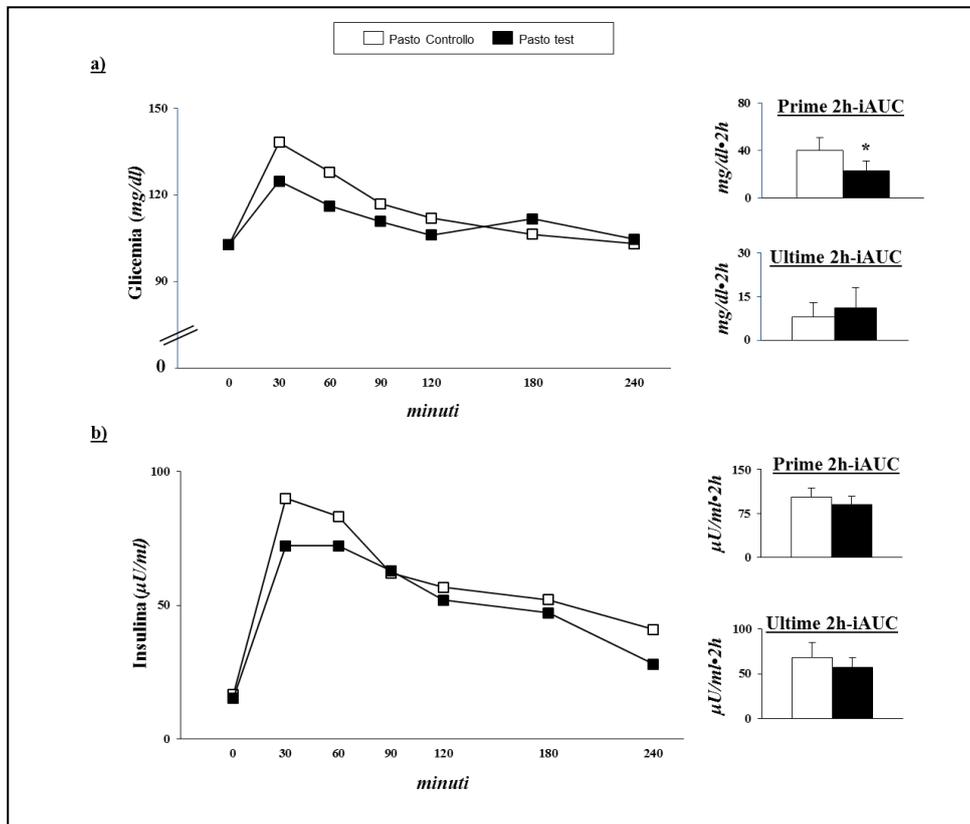
Partecipanti. Sono stati reclutati 10 volontari non diabetici (3 uomini e 7 donne), di età media 46 ± 12 anni e con un BMI medio di 30 ± 5 kg/m^2). I loro principali parametri ematochimici a digiuno sono riportati di seguito: glicemia 100 ± 9 mg/dl, colesterolo totale 172 ± 30 mg/dl, HDL-colesterolo 50 ± 14 mg/dl e trigliceridi 77 ± 22 mg/dl.

Parametri a digiuno. Non sono state osservate differenze tra i due pasti standard per quanto riguarda le concentrazioni plasmatiche a digiuno di glicemia (test: 101 ± 9 mg/dl vs.. controllo: 101 ± 8 mg/dl; p: 0.931), insulina (test: 15 ± 2 $\mu\text{l/ml}$ vs.. controllo: 17 ± 1 $\mu\text{l/ml}$; p: 0.246), trigliceridi (73 ± 7 mg/dl vs. controllo: 81 ± 7 mg/dl, p: 0.085), FFA (test: 0.49 ± 0.2 mEq/L vs.. controllo: 0.51 ± 0.2 mEq/L, p: 0.723), GLP-1 (test: 5.22 ± 1 pmol/L vs.. controllo: 5.01 ± 2 pmol/L, p: 0.737), grelina (test: 494 ± 74 pg/ml vs.. controllo: 419 ± 113 pg/ml, p: 0.196) e per l'escrezione dell'idrogeno (test: 16 ± 5 ppm vs.. controllo: 19 ± 4 ppm, p: 0.481).

Risposta metabolica postprandiale. Dopo il pasto test, la risposta glicemica risultava significativamente più bassa durante le prime due ore rispetto al pasto controllo (2h-iAUC: 23 ± 8 mg/dl•2h vs. 40 ± 11 mg/dl•2h, test e controllo, rispettivamente; p: 0.045; figura 15a). Al contrario, nel periodo postprandiale tardivo, le concentrazioni plasmatiche di glucosio erano quasi sovrapponibili per i due pasti sperimentali (2h-iAUC: 11 ± 7 mg/dl•2h vs. 8 ± 5 mg/dl•2h, test e controllo, rispettivamente; p: 0.588; figura 15a).

Le concentrazioni di insulina nel plasma erano costantemente inferiori dopo il pasto test rispetto al pasto controllo; tuttavia, le differenze tra i due pasti sperimentali non erano statisticamente significative sia per la risposta delle prime due ore (2h-iAUC: 90 ± 14 μ l/ml•2h vs. 103 ± 16 μ l/ml•2h, test e controllo, rispettivamente; p: 0.189) che per quella tardiva (2h-iAUC, 57 ± 11 μ l/ml•2h vs. 68 ± 17 μ l/ml•2h; test e controllo, rispettivamente; p: 0.236) (figura 15b).

Figura 15. Risposta glicemica (a) e insulinica (b) ai due pasti sperimentali.



I dati sono espressi come $M \pm SEM$.

* $p < 0.05$ vs. pasto controllo (t-test per dati appaiati)

Per valutare i meccanismi alla base degli effetti metabolici, abbiamo utilizzato modelli computazionali che permettono di calcolare sia il tasso di assorbimento intestinale del glucosio che la sensibilità all'insulina, calcolata come indice di sensibilità all'insulina (ISI) dopo il pasto.

I risultati dei modelli computazionali sono mostrati nella tabella 13.

L'assorbimento complessivo del glucosio nel periodo postprandiale, calcolato come 4h-iAUC, non era differente tra i due pasti sperimentali; tuttavia, l'iAUC dell'assorbimento di glucosio era significativamente più basso durante la prima ora dopo il pasto test rispetto al pasto controllo (23 ± 1 g/h vs. 27 ± 2 g/h, rispettivamente; p: 0.048).

Per quanto riguarda la sensibilità all'insulina, l'ISI era significativamente migliorato dopo il pasto test rispetto al pasto controllo (4.0 ± 0.6 vs. 3.4 ± 0.4 , rispettivamente; 0.041).

Tabella 13. Indici derivati di assorbimento intestinale di glucosio, insulino sensibilità (ISComp) e inibizione degli FFA durante i due pasti sperimentali.

Indici derivati	Pasto controllo	Pasto test
Assorbimento intestinale di glucosio ($g \cdot 4h$)	86 ± 5	89 ± 5
ISComp $((mg/dL)^2 \cdot (\mu U/mL)^2)^{-1/2}$	3.4 ± 0.4	$4.0 \pm 0.6^*$
Inibizione degli FFA ($ml/microU \cdot 4h$)	3.7 ± 1.3	$0.7 \pm 0.5^*$

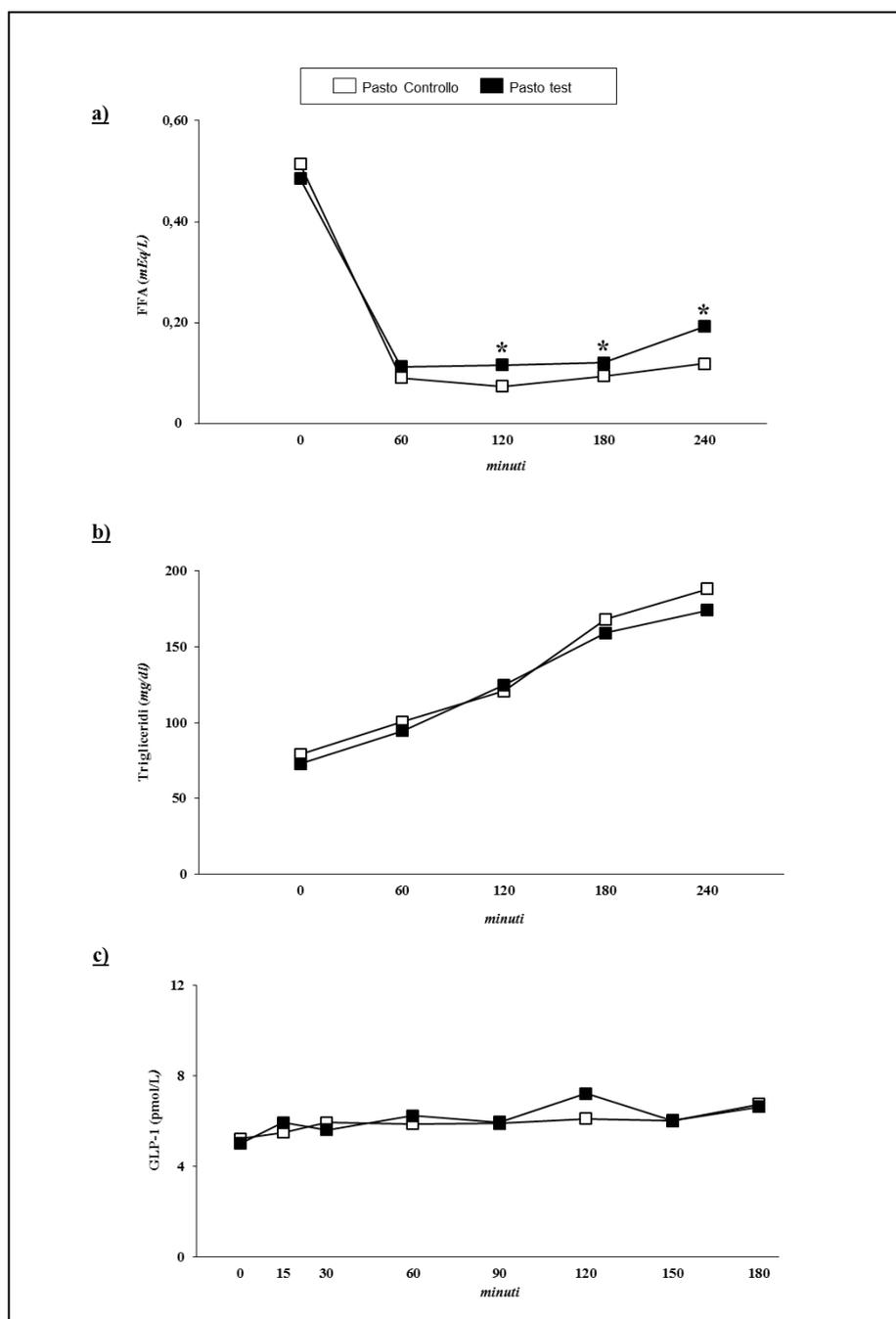
I dati sono espressi come $M \pm SEM$.

* $p < 0.05$ vs. pasto controllo (t-test per dati appaiati)

Le concentrazioni plasmatiche di FFA sono diminuite dopo entrambi i pasti sperimentali; tuttavia, il pasto test ha indotto una riduzione significativamente minore delle concentrazioni di FFA nel plasma a 120, 180 e 240 minuti (figura 16a). Tale risultato è stato confermato dall'indice di inibizione degli FFA (sFFA) che era significativamente più basso dopo il pasto test rispetto al pasto controllo (tabella 13).

Non sono state riscontrate differenze significative per i trigliceridi plasmatici e le concentrazioni GLP-1 dopo i due pasti sperimentali (figura 16b e 16c, rispettivamente).

Figura 16. Risposta di FFA (a), trigliceridi (b) e GLP-1 (c) ai due pasti sperimentali.



I dati sono espressi come $M \pm SEM$.

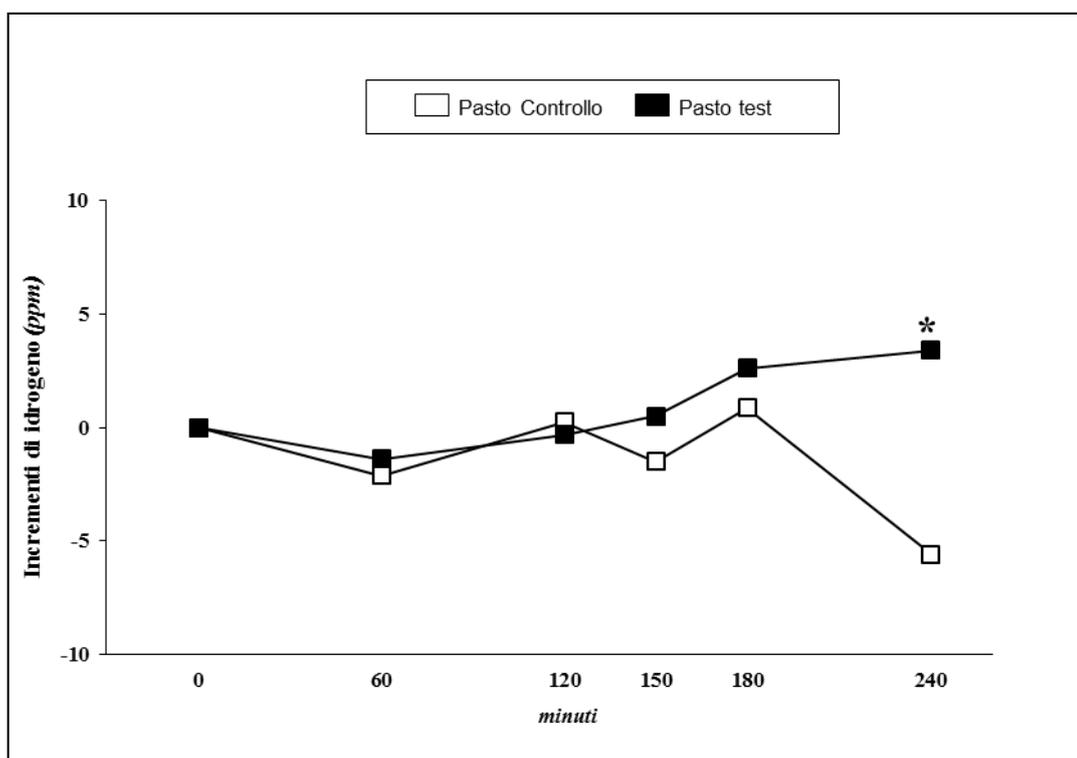
* $p < 0.05$ vs. pasto controllo (t-test per dati appaiati)

Fermentazione intestinale

La fermentazione intestinale, valutata mediante l'escrezione dell'idrogeno durante il *breath* test, non risultava differente dopo il consumo dei due pasti sperimentali. Tuttavia, esprimendo l'escrezione di idrogeno come incremento rispetto al valore a digiuno, è stata

osservato un incremento statisticamente significativo di tale parametro a 240 minuti dopo il pasto test rispetto al pasto controllo (figura 17).

Figura 17. Incrementi di idrogeno durante il *breath* test dopo il consumo dei due pasti sperimentali.



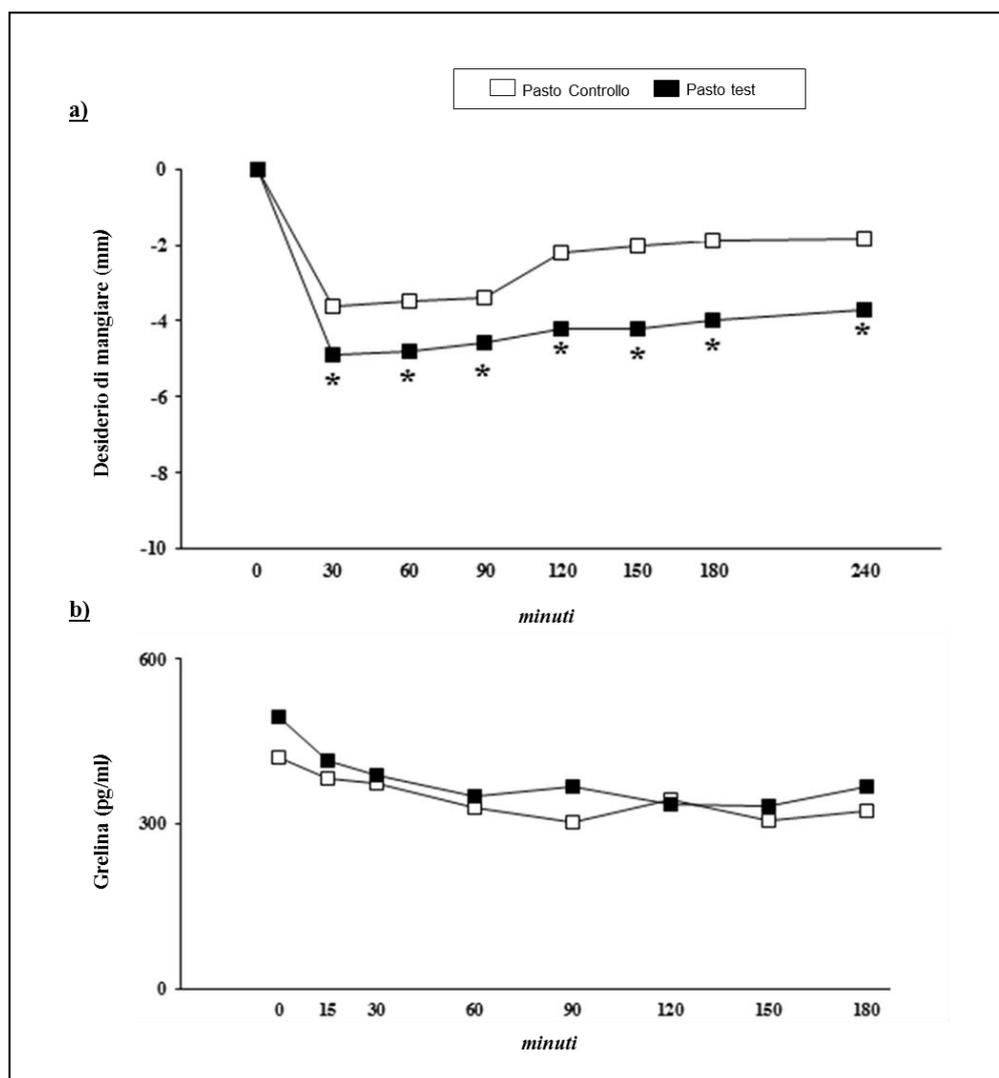
I dati sono espressi come incrementi rispetto al valore a digiuno.

* $p < 0.05$ vs. pasto controllo (t-test per dati appaiati)

Appetito

Dopo il pasto test, i partecipanti hanno riportato una significativa riduzione del desiderio di mangiare che persisteva durante le 4 ore del periodo postprandiale (figura 18a). Tuttavia, non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i due pasti sperimentali né per le altre sensazioni soggettive di appetito (senso di fame, senso di sazietà e prospettiva del consumo di cibo) né per le concentrazioni plasmatiche di grelina (figura 18b).

Figura 18. Desiderio di mangiare (a) e risposta della grelina (b) ai due pasti sperimentali.



I dati sono espressi come $M \pm SEM$.

* $p < 0.05$ vs. pasto controllo (t-test per dati appaiati)

Discussione

Il risultato principale e più rilevante di questo studio è che il consumo acuto di fette biscottate prodotte con una farina ricca di amiloso, nel contesto di un pasto standard, riduce significativamente la risposta glicemica nelle prime due ore dopo il pasto rispetto a fette biscottate convenzionali prodotte con una farina ricca in amilopectina.

È da sottolineare che la composizione bromatologica dei due pasti sperimentali era sovrapponibile in termini di quantità di carboidrati disponibili e di fibra alimentare. Ciò consente di interpretare tutte le differenze osservate nei parametri metabolici postprandiali

come conseguenza della proporzione di amilosio e amilopectina nella farina di frumento utilizzata per la preparazione dei due tipi di fette biscottate utilizzate in questo studio, in quanto rappresentavano l'unico parametro nutrizionale che era diverso tra i due pasti.

Il nostro risultato è in linea con studi precedenti che hanno osservato una riduzione della risposta glicemica postprandiale dopo il consumo di alimenti ricchi in amilosio preparati con farine di frumento [143], orzo [144,145], riso [146,147] e mais [148-150].

Il nostro studio conferma e estende i risultati degli studi precedenti fornendo informazioni rilevanti sui meccanismi alla base del miglioramento della risposta glicemica postprandiale dopo il consumo di alimenti contenenti amido ricco di amilosio.

In primo luogo, i risultati del nostro studio indicano che l' amido ricco di amilosio può influenzare positivamente la risposta glicemica postprandiale del glucosio plasmatico attraverso una velocità di digestione più lenta delle molecole di amido che può indurre un minore fabbisogno di insulina. Infatti, anche se l'assorbimento intestinale totale di glucosio (4 ore) non era differente tra i due pasti sperimentali, la significativa riduzione dell'iAUC di tale parametro durante la prima ora dopo il pasto conferma questa ipotesi.

Inoltre, in questo studio la risposta insulinica era costantemente inferiore dopo il pasto test, ma le differenze non hanno raggiunto il livello convenzionale di significatività statistica.

Questo risultato è in linea con gli studi precedenti in cui non sono stati osservati effetti significativi di prodotti ricchi di amilosio sulle concentrazioni di insulina postprandiale.

Tuttavia, alcuni studi effettuati con alimenti contenenti quantità più elevate di amilosio (60-70%) hanno mostrato una riduzione significativa delle concentrazioni di insulina.[148-150]

Le concentrazioni plasmatiche di insulina più basse dopo del pasto test potrebbero spiegare la ridotta soppressione della risposta degli FFA in fase postprandiale. Infatti, è noto che l'insulina è l'inibitore ormonale più potente della lipolisi; quindi, anche una piccola

riduzione dell'insulina può aver indotto un'inibizione minore degli FFA e, di conseguenza, la minore riduzione degli FFA nel periodo postprandiale dopo il consumo di pasto test.

I modelli computazionali basati sul rapporto tra l'insulina plasmatica e le concentrazioni di glucosio indicano che nel nostro studio anche la sensibilità insulinica postprandiale era migliorata dopo il consumo del pasto test. Ciò potrebbe essere dovuto ad una maggiore fermentazione intestinale, come mostrato dall'incremento dell'escrezione dell'idrogeno durante il *breath* test 4 ore dopo il pasto. Infatti, un aumento del contenuto di amilosio nell'amido promuove la produzione di amido resistente che sfugge alla digestione e l'assorbimento nell'intestino tenue e subisce la fermentazione ad opera del microbiota intestinale. I prodotti di fermentazione dell'amido resistente comprendono non solo gas (metano, idrogeno, anidride carbonica), ma anche acidi grassi a catena corta (SCFA: acetato, propionato, butirato) che possono influenzare positivamente la sensibilità insulinica e il metabolismo glico-lipidico.[83,84] Tuttavia, considerato che i pasti test erano valutati in acuto, verosimilmente questo meccanismo non ha avuto un ruolo di rilievo nel condizionare la risposta metabolica ai pasti.

Infine, abbiamo osservato un effetto significativo del consumo di fette biscottate prodotte con farina ricca in amilosio sul desiderio di mangiare; ciò suggerisce che tali prodotti possano influenzare l'appetito e ridurre l'introito energetico, rappresentando così un potenziale strumento per la riduzione e il mantenimento del peso corporeo. Tuttavia, questo risultato non è stato corroborato dai risultati relativi alla grelina e il GLP-1 poiché le loro concentrazioni postprandiali non differivano tra i due pasti sperimentali.

Una limitazione del nostro studio è rappresentata dalla dimensione del campione; infatti questo parametro è stato calcolato per rilevare una riduzione media di circa il 30% della risposta glicemica, ma potrebbe non essere sufficiente per osservare le variazioni di altri parametri valutati in questo studio e, in particolare, le differenze nelle risposte ormonali plasmatiche (insulina, GLP-1 e grelina).

I punti di forza del nostro studio sono il disegno di studio ben controllato e la *compliance* ottimale dei partecipanti.

In conclusione, i risultati di questo studio mostrano che il consumo di prodotti a base di farina ricca di amilosio migliora la risposta glicemica postprandiale e la sensibilità insulinica, riduce il desiderio di mangiare e aumenta la fermentazione intestinale. Pertanto, i prodotti realizzati con farina ricca di amilosio potrebbero essere utili per la prevenzione e il trattamento del sovrappeso/obesità, della ridotta tolleranza al glucosio o del diabete.

7. Conclusioni e prospettive future

Lo scopo del lavoro di tesi, svolto nell'arco del triennio, è stato quello di valutare se alcuni composti bioattivi di origine vegetale (fibra, polifenoli e amido ad alto contenuto di amilosio) contenuti in alimenti funzionali convenzionali o modificati possa influenzare in maniera efficace il metabolismo glico-lipidico in fase postprandiale nell'uomo.

In particolare, i risultati del Progetto HEALTHGRAIN hanno mostrato che il consumo di cereali integrali induce una riduzione della richiesta di insulina in fase postprandiale che sembra essere legata, almeno in parte, alla produzione di propionato in seguito alla fermentazione intestinale della fibra da parte del microbiota intestinale.

Il Progetto ETHERPATHS ci ha permesso di dimostrare che una dieta naturalmente ricca in diverse classi di polifenoli (in particolare acidi fenolici e flavonoidi) induce una riduzione significativa della trigliceridemia postprandiale e un miglioramento della tolleranza glucidica.

Infine, i risultati del Progetto AMILOSIO suggeriscono che il consumo di alimenti prodotti con farina di frumento contenente amido ricco in amilosio induce una minore risposta glicemica postprandiale entro le prime due ore dalla sua assunzione che sembra essere legata al rallentamento della digestione e dell'assorbimento del glucosio.

Pertanto, i risultati complessivi ottenuti mostrano che il consumo di alimenti funzionali contenenti composti bioattivi di origine vegetale influenza in maniera efficace il metabolismo glico-lipidico in fase post-prandiale nell'uomo.

Tuttavia, nonostante nei progetti HEALTHGRAIN e ETHERPATHS l'adesione al trattamento nutrizionale sia stata ottimale per la durata dello studio, come dimostrato dall'analisi dei diari alimentari e dal dosaggio di marcatori di consumo, bisogna considerare che a lungo termine questi livelli di adesione alle prescrizioni dietetiche tende a diminuire, come dimostrato da numerosi studi che riportano una scarsa adesione alle

raccomandazioni nutrizionali in termini di consumo di cereali integrali, frutta e verdura a livello di popolazione generale.

Pertanto, rimane valida l'ipotesi alla base di questo lavoro di tesi che selezionare o modificare specifici alimenti convenzionali per aumentarne la funzionalità potrebbe essere la chiave di volta per coinvolgere in scelte nutrizionali appropriate una fascia più ampia della popolazione. In questa prospettiva, stiamo portando avanti due nuovi studi di intervento tesi a valutare gli effetti metabolici di alimenti funzionali non convenzionali in cui la fibra e i polifenoli siano veicolati da prodotti con caratteristiche organolettiche migliori e, quindi, potenzialmente più accettabili dai consumatori, per verificare se sia possibile ottenere gli stessi effetti benefici sul metabolismo glico-lipidico ottenuti negli studi precedenti.

In particolare, per quanto riguarda i polifenoli, abbiamo sviluppato una bevanda ricca in polifenoli (625 mg/100 ml) ottenuta dall'estratto acquoso della vinaccia d'uva rossa. In uno studio randomizzato e controllato condotto secondo un disegno in crossover, il consumo di tale bevanda ha ridotto in acuto di circa il 30% la risposta insulinemica ad un pasto test (903 kcal, 18% proteine, 30% grassi, 52% carboidrati) e incrementato del 6% l'insulino- sensibilità, calcolata come indice OGIS, in un gruppo di 10 soggetti sani rispetto ad una bevanda controllo priva di polifenoli.

Per quanto riguarda la fibra, invece, abbiamo valutato gli effetti metabolici del consumo per 8 settimane di prodotti da forno arricchiti in aleurone, cioè lo strato più interno della crusca dei cereali integrali che contiene la maggior parte dei composti bioattivi (fibra, vitamine, sali minerali). I risultati dello studio sono ancora in fase di elaborazione statistica.

Questi ulteriori risultati confermano la possibilità e l'utilità della combinazione di diversi alimenti funzionali, convenzionali o modificati, nella dieta abituale della popolazione generale per facilitare l'adesione alle raccomandazioni nutrizionali in relazione al consumo

di alimenti di origine vegetale contribuendo, così, a incrementare l'*intake* giornaliero di composti bioattivi in grado di esercitare effetti benefici sulla salute dell'uomo, soprattutto in relazione al metabolismo glico- lipidico.

8. Bibliografia

1. Priebe MG, van Binsbergen JJ, de Vos R, Vonk RJ. Whole Grain Foods for the Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 2008.
2. Harris KA and P. M. Kris-Etherton PM. Effects of Whole Grains on Coronary Heart Disease Risk. *Curr Atheros Rep*, 2010; 12: 368-376.
3. Carter P, GrayLJ, Troughton J, Khunti K, Davies MJ. Fruit and Vegetable Intake and Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus: Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ*, 2010; 341: c4229-c4236.
4. Thompson AK, Minihane AM, Williams CM. Trans Fatty Acids, Insulin Resistance and Diabetes. *Eur J Clin Nutr*, 2011; 65: 553-564.
5. Hofmann SM, Tschöp MH. Dietary Sugars: A Fat Difference. *J Clin Invest*, 2009; 119:1089-1092.
6. Katan MB, Grundy SM, Willett WC. Beyond low-fat diets. *NEJM*, 1997; 337, 563–566.
7. Rivellese A, Giacco R, Genovese S, Patti L, Marotta G, Pacioni D, Annuzzi G, Riccardi G. Effects of changing amount of carbohydrate in diet on plasma lipoproteins and apolipoproteins in type II diabetic patients. *Diabetes Care*, 1990; 13, 446–448.
8. Riccardi G and Rivellese AA. Effects of dietary fiber and carbohydrate on glucose and lipoprotein metabolism in diabetic patients. *Diabetes Care*, 1991; 14, 1115–1125.
9. Sacks FM, & Katan M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am J Med*, 2002; 113: 13S–24S.

10. Kodama S, Saito K, Tanaka S, Horikawa C, Fujiwara K, Hirasawa R, Yachi Y, Sone Y, Tada Iida K, Shimano H, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Fasting and post-challenge glucose as quantitative cardiovascular risk factors: a meta-analysis. *J Atheroscler Thromb* 2012; 19:385-396.
11. Giacco R, Costabile G, Riccardi G. Metabolic effects of dietary carbohydrates: The importance of food digestion. *Food Research International*, 2016; 88: 336-341
12. Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Mediterranean diet and health. *Biofactors*, 2013; 39: 335-342.
13. Sofi F, Cesari R Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*, 2008; 337: a1344.
14. McRorie JW Jr. Evidence-Based Approach to Fiber Supplements and Clinically Meaningful Health Benefits, Part 1: What to Look for and How to Recommend an Effective Fiber Therapy. *Nutr Today*, 2015; 50:82-89.
15. Pereira MA, O'Reilly E, Augustsson K, Fraser GE, Goldbourt U, Heitmann BL et al. Dietary fiber and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of cohort studies. *Arch Intern Med*, 2004; 164:370-376.
16. Park Y, Subar AF, Hollenbeck A, Schatzkin A. Dietary fiber intake and mortality in the NIH-AARP diet and health study. *Arch Intern Med*, 2011; 171:1061-1068.
17. Grooms KN, Ommerborn MJ, Pham do Q, Djoussé L, Clark CR. Dietary fiber intake and cardiometabolic risks among US adults, NHANES 1999-2010. *Am J Med*, 2013; 126: 1059-1067.
18. Slavin JL. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc* 2008; 108:1716-1731.
19. American Heart Association Nutrition Committee, Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA et al. Diet and lifestyle

- recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 2006; 114:82-96.
20. Authors/Task Force Members, Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2013; 34:3035-3087.
21. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I et al. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med* 2008; 359:229-241.
22. Giacco R, Della Pepa G, Luongo D, Riccardi G. Whole grain intake in relation to body weight: from epidemiological evidence to clinical trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011 21:901-908.
23. Wanders AJ, van den Borne JJ, de Graaf C, Hulshof T, Jonathan MC, Kristensen M. Effects of dietary fibre on subjective appetite, energy intake and body weight: a systematic review of randomized controlled trials. *Obes Rev* 2011; 12:724-739.
24. Riccardi G, Rivellese AA, Giacco R. Role of glycemic index and glycemic load in the healthy state, in prediabetes, and in diabetes. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:S269-S274.
25. Tosh SM. Review of human studies investigating the post-prandial blood-glucose lowering ability of oat and barley food products. *Eur J Clin Nutr* 2013; 67:310-317.
26. De Natale C, Annuzzi G, Bozzetto L, Mazzarella R, Costabile G, Ciano O, Riccardi G, Rivellese AA. Effects of a plant-based high-carbohydrate/high-fiber diet versus high-monounsaturated fat/low-carbohydrate diet on postprandial lipids in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2009; 32:2168-2173.

27. Giacco R, Lappi J, Costabile G, Kolehmainen M, Schwab U, Landberg R, Uusitupa M, Poutanen K, Pacini G, Rivellese AA, Riccardi G, Mykkänen H. Effects of rye and whole wheat versus refined cereal foods on metabolic risk factors: a randomised controlled two-centre intervention study. *Clin Nutr* 2013; 32:941-949.
28. Bazzano LA, Thompson AM, Tees MT, Nguyen CH, Winham DM. Non-soy legume consumption lowers cholesterol levels: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21:94-103.
29. Giacco R, Clemente G, Cipriano D, Luongo D, Viscovo D, Patti L, Di Marino L, Giacco A, Naviglio D, Bianchi MA, Ciati R, Brighenti F, Rivellese AA, Riccardi G. Effects of the regular consumption of wholemeal wheat foods on cardiovascular risk factors in healthy people. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20:186-194.
30. Rivellese A, Riccardi G, Giacco A, Pacioni D, Genovese S, Mattioli PL, Mancini M. Effect of dietary fibre on glucose control and serum lipoproteins in diabetic patients. *Lancet* 1980; 2:447-450.
31. Cara L, Dubois C, Borel P, Armand M, Senft M, Portugal H, Pauli AM, Bernard PM, Lairon D. Effects of oat bran, rice bran, wheat fiber, and wheat germ on postprandial lipemia in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 1992; 55:81-88.
32. Rivellese AA, Giacco R, Costabile G. Dietary carbohydrates for diabetics. *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14:563-569.
33. Assmann G, Buono P, Daniele A, Della Valle E, Farinaro E, Ferns G, Krogh V, Kromhout D, Masana L, Merino J, Misciagna G, Panico S, Riccardi G, Rivellese AA, Rozza F, Salvatore F, Salvatore V, Stranges S, Trevisan M, Trimarco B, Vetrani C. Functional foods and cardiometabolic disease* International Task Force for Prevention of Cardiometabolic Diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24:1272-1300.

34. Englyst HN, Cummings JH. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *Am J Clin Nutr* 1985; 42:778-787.
35. Thompson DB. Strategies for the manufacture of resistant starch. *Trends Food Sci Technol* 2000; 11:245-253.
36. Sestili F. Manipolazione genetica della composizione dell'amido. 2008
37. Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S. High throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol* 2011; 126: 480–484.
38. Slade AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, Steine MN, Facciotti D. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat Biotechnol* 2005; 23:75-81.
39. Nugent AP. Health properties of resistant starch. *Nutr Bull* 2005; 30:27-54.
40. Topping D. Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. *J Cereal Sci* 2007; 46:220-229.
41. Bhave M, Morris CF. Molecular genetics of puroindolines and related genes: regulation of expression, membrane binding properties and applications. *Plant Mol Biol* 2008; 66:221-231.
42. Birt DF, Boylston T, Hendrich S, Jane JL, Hollis J, Li L, McClelland J, Moore S, Phillips GJ, Rowling M, Schalinske K, Scott MP, Whitley EM. Resistant starch: promise for improving human health. *Adv Nutr* 2013; 4: 587-601.
43. Blennow A, Jensen SL, Shaik SS, Skryhan K, Carciofi M, Holm PB, Hebelstrup KH, Tanackovic V. Future cereal starch bioengineering: cereal ancestors encounter gene technology and designer enzymes. *Cereal Chem* 2013; 90:274–287.
44. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727–747.

45. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18:1818-1892.
46. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità* 2007; 43: 348-361.
47. Visioli F, Alarcón De La Lastra C, Andres-Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A, D'Archivio M, Faria A, Favé G, Fogliano V, Llorach R, Vitaglione P, Zoratti M, Edeas M. Polyphenols and Human Health: A Prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011; 51:524-546.
48. Bohn T, McDougall GJ, Alegría A, Alminger M, Arrigoni E, Aura AM, Brito C, Cilla A, El SN, Karakaya S, Martínez-Cuesta MC, Santos CN. Mind the gap--deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites--a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59:1307-1323.
49. Vetrani C, Rivellese AA, Annuzzi G, Mattila I, Meudec E, Hyötyläinen T, Orešič M, Aura AM. Phenolic metabolites as compliance biomarker for polyphenol intake in a randomized controlled human intervention. *Food Research International*, 2014; 63: 233-238.
50. Vetrani C, Rivellese AA, Annuzzi G, Adiels M, Borén J, Mattila I, Orešič M, Aura AM. Metabolic transformations of dietary polyphenols: comparison between in vitro colonic and hepatic models and in vivo urinary metabolites. *J Nutr Biochem*, 2016; 33:111-118.
51. Carratù B, Sanzini E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Ann Ist Super Sanità* 2005; 41:7-16.

52. Hollman PC, Geelen A, Kromhout D. Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *J Nutr* 2010; 140:600-604.
53. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:560-568.
54. Arts I.C. and Hollman, P.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:317S-325S.
55. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food* 2005; 8:281–290.
56. Wedick NM, Pan A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, Willett W, Hu FB, Sun Q, van Dam RM. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr* 2012; 95:925–933.
57. Leifert W. R , Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr Res* 2008; 28:729-737.
58. Rasmussen S E, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, Poulsen L. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49:159–174.
59. Aron P and Kennedy J. Flavan-3-ols: “Nature, occurrence and biological activity”. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:79–104.
60. Ghosh D and Scheepens A. Vascular action of polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53:322–331.
61. Williamson G and Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:243S.
62. Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54:37-59.

63. Tokede OA, Gaziano JM, Djoussé L. Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65:879-886.
64. Babu PV, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* 2013; 24:1777–1789.
65. Venables MC, Hulston CJ, Cox HR, Jeukendrup AE. Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:778–784.
66. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Ros E, Valderas-Martinez P, Casas R, Arranz S, Guillén M, Lamuela-Raventós RM, Llorach R, Andres-Lacueva C, Estruch R. Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: a randomized clinical trial. *Clin Nutr* 2013; 32:200–206.
67. Van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ, Van Dam RM. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care* 2009; 32:1023–1025.
68. Williamson G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57:48-57.
69. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci* 2010; 11:1365-1402.
70. Rivellese AA, Iovine C, Ciano O, Costagliola L, Galasso R, Riccardi G, Vaccaro O. Nutrient determinants of postprandial triglyceride response in a population-based sample of type II diabetic patients. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60:1168-1173.
71. Cust AE, Skilton MR, van Bakel MM, Halkjaer J, Olsen A, Agnoli C, Psaltopoulou T, Buurma E, Sonestedt E, Chirlaque MD, Rinaldi S, Tjønneland A, Jensen MK, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Kaaks R, Nöthlings U, Chloptsios Y, Zylis D, Mattiello A, Caini S, Ocké MC, van der Schouw YT, Skeie G, Parr CL,

- Molina-Montes E, Manjer J, Johansson I, McTaggart A, Key TJ, Bingham S, Riboli E, Slimani N. Total dietary carbohydrate, sugar, starch and fibre intakes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63:S37-S60.
72. Sette S, Le Donne C, Piccinelli R, Arcella D, Turrini A, Leclercq C; INRAN-SCAI 2005-6 Study Group. The third Italian National Food Consumption Survey, INRAN-SCAI 2005-06--part 1: nutrient intakes in Italy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21:922-932.
73. King DE, Mainous AG 3rd, Lambourne CA. Trends in dietary fiber intake in the United States, 1999-2008. *J Acad Nutr Diet* 2012; 112:642-648.
74. Lachat C, Nago E, Verstraeten R, Roberfroid D, Van Camp J, Kolsteren P. Eating out of home and its association with dietary intake: a systematic review of the evidence. *Obes Rev* 2012; 13:329-346.
75. Adams JF and Engstrom A. Helping consumers achieve recommended intakes of whole grain foods. *J Am Coll Nutr* 2000; 19:339S-344S.
76. Vetrani C e Riccardi G. Alimenti funzionali e Nutraceutici. *Trattato di Nutrizione Umana*. Ed. Idelson-Gnocchi 2017, in stampa.
77. Roberfroid MB. Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr* 2002; 88:S133-S138.
78. Giacco R, De Giulio B, Vitale M, Cozzolino R. Functional Foods: Can Food Technology Help in the Prevention and Treatment of Diabetes? *Food and Nutrition Sciences* 4:827-837, 2013.
79. Regolamento (UE) N. 432/2012 della Commissione del 16 maggio 2012 relativo alla compilazione di un elenco di indicazioni sulla salute consentite sui prodotti alimentari, diverse da quelle facenti riferimento alla riduzione dei rischi di malattia

e allo sviluppo e alla salute dei bambini. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 25.5.2012.

80. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), Turck D, Bresson J-L, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, Hirsch-Ernst KI, Mangelsdorf I, McArdle HJ, Naska A, Neuhäuser-Berthold M, Nowicka G, Pentieva K, Sanz Y, Sjodin A, Stern M, Tomé D, Van Loveren H, Vinceti M, Willatts P, Martin A, Strain JJ, Heng L, Valtueña Martinez S and Siani A. Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of a health claim application (Revision 2). *EFSA Journal* 2017; 15:4680.
81. Ye EQ, Chacko SA, Chou EL, Kugizaki M, Liu S. Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain. *J Nutr* 2012; 142:1304–1313.
82. Cho SS, Qi L, Fahey GC Jr, Klurfeld DM. Consumption of cereal fiber, mixtures of whole grains and bran, and whole grains and risk reduction in type 2 diabetes, obesity, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2013; 98:594–619.
83. Robertson DM. Metabolic cross talk between the colon and the periphery: Implications for insulin sensitivity. *Proc Nutr Soc* 2007; 66:351–361.
84. Nilsson A, Ostman E, Preston T, Björck I. Effects of GI vs content of cereal fibre of the evening meal on glucose tolerance at a subsequent standardized breakfast. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62:712–720.
85. Robertson MD, Currie JM, Morgan LM, Jewell DP, Frayn KN. Prior short-term consumption of resistant starch enhances postprandial insulin sensitivity in healthy subjects. *Diabetologia* 2003; 46:659–665.
86. Robertson MD, Bickerton AS, Dennis AL, Vidal H, Frayn KN. Insulin-sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:559–567.

87. Weickert MO, Mohlig M, Koebnick C, Holst JJ, Namsolleck P, Ristow M, Osterhoff M, Rochlitz H, Rudovich N, Spranger J, Pfeiffer AF. Impact of cereal fibre on glucose-regulating factors. *Diabetologia* 2005; 48:2343–2353.
88. Hartvigsen ML, Lærke HN, Overgaard A, Holst JJ, Bach Knudsen KE, Hermansen K. Postprandial effects of test meals including concentrated arabinoxylan and whole grain rye in subjects with the metabolic syndrome: A randomised study. *Eur J Clin Nutr* 2014; 68:567–574.
89. Nordlund E, Aura AM, Mattila I, Kössö T, Rouau X, Poutanen K. Formation of phenolic microbial metabolites and short-chain fatty acids from rye, wheat, and oat bran and their fractions in the metabolical in vitro colon model. *J Agric Food Chem* 2012; 60:8134–8145.
90. Karppinen S, Liukkonen K, Aura AM, Forssell P, Poutanen K. In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. *J Sci Food Agric* 2000; 80:1469–1476.
91. Freeland KR, Wilson C, Wolever TM. Adaptation of colonic fermentation and glucagon-like peptide-1 secretion with increased wheat fibre intake for 1 year in hyperinsulinaemic human subjects. *Br J Nutr* 2010; 103:82–90.
92. Giacco R, Costabile G, Della Pepa G, Anniballi G, Griffio E, Mangione A, Cipriano P, Viscovo D, Clemente G, Landberg R, Pacini G, Rivellese AA. A whole grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24:837–844.
93. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP)

- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421.
94. Anthropometric Standardization Reference Manual. Lohman TM, Roche AF, Martorell R, eds. Human Kinetics Pub, 1988.
95. Remsey C, Demigne C. Determination of volatile fatty acids in plasma after ethanolic extraction. *Biochemistry* 1974;141:85-91.
96. Landberg R, Kamal-Eldin A, Andersson A, Vessby B, Aman P. Alkylresorcinols as biomarkers of whole-grain wheat and rye intake: Plasma concentration and intake estimated from dietary records. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:832-838.
97. Venter CS, Vorster HH, Cummings JH. Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. *Am J Gastroenterol* 1990; 85:549-553.
98. Liljeberg HG, Lönner CH, Björck IM. Sourdough fermentation or addition of organic acids or corresponding salts to bread improves nutritional properties of starch in healthy humans. *J Nutr* 1995; 125:1503-1511.
99. Liljeberg HG, Björck IM. Delayed gastric emptying rate as a potential mechanism for lowered glycemia after eating sourdough bread: Studies in humans and rats using test products with added organic acids or an organic salt. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:886-893.
100. Darwiche G, Ostman EM, Liljeberg HG, Kallinen N, Björgell O, Björck IM, Almér LO. Measurements of the gastric emptying rate by use of ultrasonography: Studies in humans using bread with added sodium propionate. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:254-258.
101. Luo J, Rizkalla SW, Alamowitch C, Boussairi A, Blayo A, Barry JL, Laffitte A, Guyon F, Bornet FR, Slama G. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose

- production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. *Am J Clin Nutr* 1996; 63:939–945.
102. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anad S. Global burden of cardiovascular disease Part II: variation in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation* 2001; 104:2855-2864.
103. Stephens JW, Carman JE, Prior SL, Jones DA, Price DE. Glycaemic control and other cardiovascular risk factors should be targeted independently in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2011; 217:297-298.
104. Rivellese AA. Diet and cardiovascular disease: beyond cholesterol. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 6:395-398.
105. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. “Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women”. *JAMA* 2007; 298:299-308.
106. Blaak EE, Antoine JM, Benton D, Björck I, Bozzetto L, Brouns F, Diamant M, Dye L, Hulshof T, Holst JJ, Lamport DJ, Laville M, Lawton CL, Meheust A, Nilson A, Normand S, Rivellese AA, Theis S, Torekov SS, Vinoy S. Impact of postprandial glycaemia on health and prevention of disease. *Obes Rev* 2012; 13:923-984.
107. Bahramsoltani R, Ebrahimi F, Farzaei MH, Baratpournoghaddam A, Ahmadi Borkani P, Rostamiasrabadi P, Rasouli Amirabadi AH, Rahimi R. Dietary polyphenols for atherosclerosis: A comprehensive review and future perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 6:0. doi: 10.1080/10408398.2017.1360244.
108. Visioli F, Hagen TM. Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: focus on micronutrients. *Pharmacol Res* 2007; 55:199-206.

109. Xun P, He K. Fish Consumption and Incidence of Diabetes: meta-analysis of data from 438,000 individuals in 12 independent prospective cohorts with an average 11-year follow-up. *Diabetes Care* 2012; 35:930-938.
110. Liu YJ, Zhan J, Liu XL, Wang Y, Ji J, He QQ. Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Nutr* 2014; 33:59-63.
111. Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, Meier G. n-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* 2002; 112:298-304.
112. Stoke KS, Baer DJ. Tea consumption may improve biomarkers of insulin sensitivity and risk factors for diabetes. *J Nutr* 2008; 138:1584S-1588S.
113. Trautwein EA, Du Y, Meyen E, Yan X, Wen Y, Wang H, Molhuizen HO. Purified black tea theaflavins and theaflavins/cathechin supplements did not affect serum lipids in healthy individuals with mildly to moderately elevated cholesterol concentrations. *Eur J Nutr* 2009; 49:27-35.
114. Naissides M, Mamo JC, James AP, Pal S. The effect of acute red wine polyphenol consumption on postprandial lipaemia in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2004; 177:401-408.
115. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service. "USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1". Nutrient data Laboratory, 2007.
116. Box, JD. "Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters". *Water Res* 1983; 17:511-25.
117. Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L, Patti L, Iovine C, Coppola S, Del Prato S, Riccardi G, Annuzzi G. Exogenous and endogenous postprandial lipid

- abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2153-2159.
118. Pacini G, Mari A. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and beta-cell function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17:305-322.
119. Stadler M, Pacini G, Petrie J, Luger A, Anderwald C; RISC Investigators. Beta cell (dys)function in non-diabetic offspring of diabetic patients. *Diabetologia*, 2009; 52:2435-2444.
120. Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, Cassidy A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr* 2012; 95:740-751.
121. Burton-Freeman B. Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science. *Br J Nutr* 2010; 104:S1-S14.
122. Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50:211-217.
123. Spitteller G. Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic Biol Med* 2006; 41:362-387.
124. Qa'dan F, Verspohl EJ, Nahrstedt A, Petereit F, Matalka KZ. Cinchonain Ib isolated from *Eriobotrya japonica* induces insulin secretion in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2009; 124:224-227.
125. Liu IM, Chen WC, Cheng JT. Mediation of beta-endorphin by isoferulic acid to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307:1196-1204.

126. Zunino SJ, Storms DH, Stephensen CB. Diets rich in polyphenols and vitamin A inhibit the development of type I autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Nutr* 2007; 137:1216-1221.
127. Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, D'Archivio M, Santangelo C, Giovannini C. Cyanidin-3-O- β -glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPAR γ activity in human omental adipocytes. *Diabetes* 2011; 60:2234-2244.
128. Rains TM, Agarwal S, Maki KC. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *J Nutr Biochem* 2011; 22:1-7.
129. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000; 130:2073S-2085S.
130. Jeon JS, Ryoo N, Hahn TR, Walia H, Nakamura Y. Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol Biochem* 2010; 48:383-392.
131. Blennow A. Starch bioengineering. In: Eliasson A.C., editor. *Starch in Food*. Woodhead Publishing Limited; Cambridge, England: 2004. pp. 97–127.
132. Blazek J, Copeland L. Pasting and swelling properties of wheat flour and starch in relation to amylose content. *Carbohydr Polym* 2008; 71:380–387.
133. Copeland L, Blazek J, Salman H, Tang MC. Form and functionality of starch. *Food Hydrocoll* 2009; 23:1527–1534.
134. Lafiandra D, Sestili F, D'Ovidio R, Janni M, Botticella E, Ferrazzano G, Silvestri M, Ranieri R, DeAmbrogio E. Approaches for modification of starch composition in durum wheat. *Cereal Chem* 2010; 87:28–34.
135. Blennow A, Jensen SL, Shaik SS, Skryhan K, Carciofi M, Holm PB, Hebelstrup KH, Tanackovic V. Future cereal starch bioengineering: cereal ancestors encounter gene technology and designer enzymes. *Cereal Chem* 2013; 90:274–287.

136. Asp NG, Van Amelsvoort JMM, Hautvast JGAJ. Nutritional implications of resistant starch. *Nutr Res Rev* 1996; 9:1–31.
137. Rahman S, Bird A, Regina A, Li Z, Philippe Ral J, McMaugh S, Topping D, Morell M. Resistant starch in cereals: exploiting genetic engineering and genetic variation. *J Cereal Sci* 2007; 46:251–260.
138. Raben A, Tagliabue A, Astrup A. The reproducibility of subjective appetite scores. *Br J Nutr* 1995; 73:517-30.
139. Ibrügger S, Vignæs LK, Blennow A, Skuflić D, Raben A, Lauritzen L et al. Second meal effect on appetite and fermentation of wholegrain rye foods. *Appetite* 2014; 80:248-56.
140. Matsuda M and DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. Comparison with the euglycaemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22:1462–70.
141. Anderwald C, Gastaldelli A, Tura A, Krebs M, Promintzer-Schifferl M, Kautzky-Willer A, et al. Mechanism and effects of glucose absorption during an oral glucose tolerance test among females and males. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:515-24.
142. Morbiducci U, Di Benedetto G, Kautzky-Willer A, Deriu MA, Pacini G, Tura A. Identification of a model of non-esterified fatty acids dynamics through genetic algorithms: the case of women with a history of gestational diabetes. *Comput Biol Med* 2011; 41:146-53.
143. Hallström E, Sestili F, Lafiandra D, Björck I, Ostman E. A novel wheat variety with elevated content of amylose increases resistant starch formation and may beneficially influence glycaemia in healthy subjects. *Food Nutr Res* 2011; 55. doi:10.3402/fnr.v55i0.7074.

144. Granfeldt Y, Liljeberg H, Drews A, Newman R, Björck I. Glucose and insulin responses to barley products: influence of food structure and amylose-amylopectin ratio. *Am J Clin Nutr* 1994; 59:1075-82.
145. Keogh JB, Lau CW, Noakes M, Bowen J, Clifton PM. Effects of meals with high soluble fibre, high amylose barley variant on glucose, insulin, satiety and thermic effect of food in healthy lean women. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61:597-604.
146. Goddard MS, Young G, Marcus R. The effect of amylose content on insulin and glucose responses to ingested rice. *Am J Clin Nutr* 1984; 39:388-92.
147. Zenel AM, Stewart ML. High Amylose White Rice Reduces Post-Prandial Glycemic Response but Not Appetite in Humans. *Nutrients* 2015; 7:5362-74.
148. Behall KM, Scholfield DJ, Yuhaniak I, Canary J. Diets containing high amylose vs amylopectin starch: effects on metabolic variables in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1989; 49:337-44.
149. Behall KM, Howe JC. Effect of long-term consumption of amylose vs amylopectin starch on metabolic variables in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:334-40.
150. Behall KM, Hallfrisch J. Plasma glucose and insulin reduction after consumption of breads varying in amylose content. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:913-20.

9. Pubblicazioni

Pubblicazioni di studi sperimentali oggetto della tesi di dottorato:

1. **Vetrani C**, Sestili F, Vitale M, Botticella E, Giacco R, Griffo E, Costabile G, Cipriano P, Tura A, Pacini G, Rivellese AA, Lafiandra D, Riccardi G. Metabolic response to amylose-rich wheat-based rusks in overweight individuals. *Eur J Nutr*, *under review*.
2. **Vetrani C**, Vitale M, Bozzetto L, Della Pepa G, Coccozza S, Costabile G, Mangione A, Cipriano P, Annuzzi G, Rivellese AA. Association between different dietary polyphenol subclasses and the improvement of cardiometabolic risk factors: evidence from a randomized controlled clinical trial. *Acta Diabetologica*, *under review*.
3. **Vetrani C**, Costabile G, Luongo D, Naviglio D, Rivellese AA, Riccardi G, Giacco R. Effects of wholegrain cereal foods on plasma short chain fatty acid concentrations in individuals with the metabolic syndrome. *Nutrition*, 2015; 32:217-221.
4. Bozzetto L, Annuzzi G, Pacini G, Costabile G, **Vetrani C**, Vitale M, Griffo E, Giacco A, De Natale C, Coccozza S, Della Pepa G, Tura A, Riccardi G, Rivellese AA. Polyphenol-rich diets improve glucose metabolism in people at high cardiometabolic risk: a controlled randomized intervention trial. *Diabetologia*, 2015; 58:1551-1560.
5. Annuzzi G, Bozzetto L, Costabile G, Giacco R, Mangione A, Anniballi G, Vitale M, **Vetrani C**, Cipriano P, Della Corte G, Pasanisi F, Riccardi G, Rivellese AA. Diets naturally rich in polyphenols improve fasting and postprandial dyslipidemia and reduce oxidative stress: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 2014; 99:463-471.

Pubblicazioni attinenti:

1. Costabile G, Griffo E, Cipriano P, **Vetrani C**, Vitale M, Mamone G, Rivellesse AA, Riccardi G, Giacco R. Acute effects of experimental wholemeal vs refined pasta on appetite and gut hormone responses in healthy subjects. *Appetite*, *under review*.
2. Marventano S, **Vetrani C**, Vitale M, Godos J, Riccardi G, Grosso G. Whole Grain Intake and Glycaemic Control in Healthy Subjects: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 2017; 9(7).
3. Pirro M, **Vetrani C**, Bianchi C, Mannarino MR, Bernini F, Rivellesse AA. Joint position statement on "Nutraceuticals for the treatment of hypercholesterolemia" of the Italian Society of Diabetology (SID) and of the Italian Society for the Study of Arteriosclerosis (SISA). *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2017;27:2-17.
4. **Vetrani C**, Rivellesse AA, Annuzzi G, Adiels M, Borén J, Mattila I, Orešič M, Aura AM. Metabolic transformations of dietary polyphenols: comparison between in vitro colonic and hepatic models and in vivo urinary metabolites. *J Nutr Biochem*, 2016; 33:111-118.
5. Assmann G, Buono P, Daniele A, Della Valle E, Farinaro E, Ferns G, Krogh V, Kromhout D, Masana L, Merino J, Misciagna G, Panico S, Riccardi G, Rivellesse AA, Rozza F, Salvatore F, Salvatore V, Stranges S, Trevisan M, Trimarco B, **Vetrani C**. Functional foods and cardiometabolic disease* International Task Force for Prevention of Cardiometabolic Diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24:1272-300.
6. Bondia-Pons I, Pöhö P, Bozzetto L, **Vetrani C**, Patti L, Aura AM, Annuzzi G, Hyötyläinen T, Rivellesse AA, Orešič M. Isoenergetic diets differing in their n-3 fatty acid and polyphenol content reflect different plasma and HDL-fraction lipidomic profiles in subjects at high cardiovascular risk. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58:1873-1882.

Altre pubblicazioni:

1. Della Pepa G, **Vetrani C**, Lombardi G, Bozzetto L, Annuzzi G, Rivellese AA. Isocaloric dietary changes and non-alcoholic fatty liver disease in high cardiometabolic risk individuals. *Nutrients*, *in press*.
2. Taskinen MR, Söderlund S, Bogl LH, Hakkarainen A, Matikainen N, Pietiläinen KH, Räsänen S, Lundbom N, Björnson E, Eliasson B, Mancina RM, Romeo S, Alméras N, Pepa GD, **Vetrani C**, Prinster A, Annuzzi G, Rivellese A, Després JP, Borén J. Adverse effects of fructose on cardiometabolic risk factors and hepatic lipid metabolism in subjects with abdominal obesity. *J Intern Med*, 2017; 282:187-201.
3. Costabile G, Della Pepa G, Bozzetto L, Annuzzi G, **Vetrani C**, Giacco R, Della Corte G, Conte FS, Di Marino L, Rivellese AA. Urine 8-Isoprostane in Relation to Adiposity and Insulin Resistance in Individuals at High Cardiometabolic Risk. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015; 13:187-191.